

BEEINFLUSSUNG DER SEROTONIN-
FREISETZUNG AUS THROMBOCYTEN
DURCH CALMODULINANTAGONISTEN

Hans-Ulrich Heller

Diss
München
1986

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm.

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Dr. K. Gietzen;

vorgelegt über Professor Dr. A. Schmid

**BEEINFLUSSUNG DER SEROTONIN-
FREISETZUNG AUS THROMBOCYTEN
DURCH CALMODULINANTAGONISTEN**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen

Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

von

Hans-Ulrich Heller

aus

Geislingen-Eybach

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. A. Schmid

Korreferent: Prof. Dr. H.P. Jennissen

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

I	<u>EINLEITUNG</u>	I
II	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	3
1.	<u>Thrombocyten</u>	3
1.1	Morphologie und Herkunft	3
1.2	Adhäsion	5
1.3	Aggregation	5
1.4	Sekretion	6
1.5	Vermittlung der Aggregation und Sekretion	7
2.	<u>Calmodulin</u>	8
3.	<u>Calmodulin-beeinflußte Systeme in Thrombocyten</u>	14
3.1	Stoffwechsel der Prostaglandine	14
3.2	Phosphorylierung der Myosin-"light-chain"-Kinase	15
3.3	Energiestoffwechsel	17
3.4	Beeinflussung der Thrombocytenreaktion durch cyclo-AMP	18
4.	<u>Calmodulinantagonisten</u>	20
III	<u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	24
1.	<u>Experimentelle Problemstellung</u>	24
2.	<u>Verwendete Materialien</u>	24
3.	<u>Präparation der Thrombocyten</u>	26
4.	<u>Aufnahme von Serotonin in die Thrombocyten</u>	27
5.	<u>Freisetzung von Serotonin</u>	30
6.	<u>Hemmung der Serotonin-Freisetzung</u>	35

7.	<u>Berechnung der Ergebnisse</u>	37
7.1	Prozentwerte	
7.2	Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des arithmetischen Mittels (SE)	39
8.	<u>Ergebnisse</u>	40
	- Trifluoperazin	41
	- Trans-Flupentixol	43
	- Cis-Flupentixol	45
	- Cloxacepride	47
	- ML 1234	49
	- ML 1257	51
	- ML 1301	53
	- ML 1389	55
	- ML 1412	57
	- ML 1423	59
	- Calmidazolium	61
IV	<u>DISKUSSION</u>	63
V	<u>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY</u>	71
VI	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	75

I EINLEITUNG

Serotonin wird in den enterochromaffinen Zellen des Magen-Darm-Traktes und im Zentralnervensystem aus der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert.

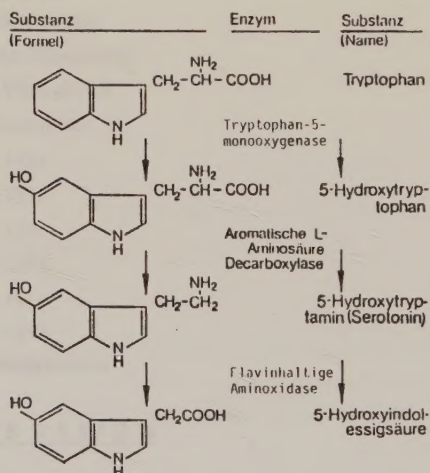


Abbildung 1: Biosynthese und Abbau des Serotonin
(SCHMIDT, 1977)

Es wirkt im ZNS als Neurotransmitter und kontrahierend auf die glatte Muskulatur. Im Blut wird es von den zirkulierenden Thrombocyten aufgenommen und in den dichten Granula neben Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Calcium gespeichert.

Bei der Zusammenballung der Thrombocyten (Aggregation) wird Serotonin ausgeschüttet und dadurch eine lokale Vasokonstriktion hervorgerufen.

SMOAKE et al. (1974) und MUSZBEK et al. (1977) berichteten, daß Blutplättchen relativ große Mengen an Calmodulin enthalten.

Calmodulin ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, so auch der Exozytose, beteiligt.

WHITE und RAYNOR untersuchten 1980 die Wirkung von Trifluoperazin, und NISHIKAWA und HIDAKA 1982 die von Naphthalensulfonamid-Derivaten auf die Funktion (Aggregation und Serotoninfreisetzung) der Plättchen.

Diese Substanzen üben, wie alle membranpermeablen Calmodulin-Inhibitoren, auch auf Calmodulin-unabhängige Systeme Effekte aus.

Da aber an intakten Thrombocyten nur membranpermeable Inhibitoren wirken können, sollten in der vorliegenden Arbeit durch die Untersuchung einer größeren Zahl von Pharmaka mit bekannter Anti-Calmodulin-Wirkung folgende Punkte geklärt und abgesichert werden:

- A Findet eine Hemmung der Serotonin-Freisetzung statt?
- B Ist Calmodulin in den Serotonin-Freisetzungs-Mechanismus involviert?
- C Sind Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erkennen?
- D Ist diese Wirkung stereospezifisch?

II LITERATURÜBERSICHT

I. Thrombocyten

1.1 Morphologie (WHITE, 1977) und Herkunft (LEONHARDT, 1977)

Die Thrombocyten entstammen den Megakaryocyten des Knochenmarks. Sie entstehen aus diesen Zellen durch Abschnürung und besitzen keinen Zellkern. Nach wiederholter Thrombocytenbildung geht der Megakaryocyt zugrunde.

Die zirkulierenden Plättchen haben eine Scheibenform mit einem Durchmesser von ca. 3-4 μm und einer Dicke von 1 μm . Ihre Lebensdauer beträgt ungefähr zehn Tage.

Ultrastrukturell sind von außen nach innen drei Zonen zu unterscheiden, die periphere Zone, die Solgelzone und die Organellenzone.

Die periphere Zone

Sie besteht in der Hauptsache aus der Thrombocytenmembran, die das Plättcheninnere vor äußeren Einflüssen schützt. Diese Membran wird außen von einer 15 - 20 nm starken Schicht bedeckt, die sich in das innere, offene kanalikuläre System fortsetzt und zudem durch einen hohen Gehalt an Mucopolysacchariden gekennzeichnet ist. Außerdem enthält sie eine Reihe von Glycoproteinen (u.a. Glycoprotein Ib und Is und IIb/IIIa).

Zudem sind eine Reihe von Gerinnungsfaktoren an die Oberfläche adsorbiert und Bindungsstellen für den Faktor Xa beschrieben.

Unter der Thrombocytenmembran befindet sich ein Bezirk dünner Filamente, die in die Membran einmünden. Sie dürften zur Erhaltung der Plättchenform dienen und während der viskosen Metamorphose von Bedeutung sein.

Die Solgelzone

Sie besteht aus einem zirkulären Bündel von Mikrotubuli, die aus 12 bis 15 Mikrofilamenten bestehen und aus freien Mikrofilamenten. Sie ist für die interne Transformation, die Freisetzung der Granula und die Retraktion von Bedeutung.

Die Organellenzone

Sie enthält Granula, Mitochondrien und membranöse Strukturen. Die Granula lassen sich morphologisch und funktionell in α -Granula, δ -Granula und λ -Granula unterscheiden.

Die α -Granula sind leicht und mehr oder weniger elektronendicht. Sie enthalten Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin, Fibrinogen und "platelet-derived-growth-factor".

Die δ -Granula (dense-bodies, dichte Granula) sind die schwersten Teilchen und wirken elektronenmikroskopisch fast schwarz. Sie enthalten in hoher Konzentration Serotonin, welches aus Zellen der Darmwand stammt und von den Plättchen aus dem Blut aufgenommen wird. Außerdem enthalten sie Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Calcium.

Die λ -Granula enthalten eine Reihe saurer Hydrolasen.

1.2 Adhäsion

Unter Adhäsion versteht man das Haften von Plättchen an fremden Oberflächen. In vivo haften Plättchen an Kollagenfasern und an der Basalmembran des Gefäßendothels, jedoch nicht an Leukozyten, Erythrocyten und Endothelzellen.

Die Entdeckung, daß Endothelzellen ein Plättchen hemmendes Prostaglandin (PGI_2) produzieren, führte zu der Annahme, daß eine fortgesetzte Produktion dieses Prostacyclins das Haften der Plättchen an den Endothelzellen verhindert (MONCADA et al. 1978; GRYGLEWSKI et al. 1978). Dies kann jedoch nicht die vollständige Erklärung sein, da andere Untersuchungen mit Prostacyclin-Antikörpern ergaben, daß die zirkulierende Menge an Prostacyclin zu niedrig ist, um die Plättchen zu hemmen (SMITH et al. 1978; STEER et al. 1980).

Die Haftung der Plättchen an Kollagen erfolgt zwischen Membranglycoprotein Ib/Is der Plättchen und einer bestimmten Aminosäuresequenz im Kollagenmolekül. Die Brücke wird durch den von Willebrand-Faktor des Blutes hergestellt, für den die oben genannten Strukturen als Rezeptoren dienen (WEISS et al. 1973).

1.3 Aggregation

Nach der Adhäsion der Plättchen an die verletzte Gefäßwand vergrößert sich der hämostatische Pfropf durch Haftung der Plättchen aneinander.

GAARDENER et al. (1961) beobachteten, daß exogenes ADP die Plättchenaggregation auslösen kann. Weitere Untersuchungen führten zu verschiedenen anderen Plättchen-Agonisten von physiologischer Bedeutung, wie Thrombin, Adrenalin und Kollagen, welche über spezifische Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche zu wirken scheinen.

Bei einer Stimulation durch Adrenalin wird keine der Aggregation vorausgehende Gestaltsänderung beobachtet (O'BRIEN, 1965), während die Stimulation durch ADP, Thrombin und Kollagen unmittelbar zu einer isovolumetrischen Formveränderung der Plättchen führt. Aus dem scheibenförmigen Thrombocyten wird eine mit Pseudopodien besetzte Kugel (FEINBERG et al. 1974).

Für die Gestaltsänderung ist kein exogenes Calcium notwendig, jedoch wird ein Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration beobachtet (NACHMIAS et al. 1977).

Fibrinogen reagiert nicht mit unstimulierten Plättchen, da erst die Anlagerung von Agonisten an ihre Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche spezifische Bindungsstellen für Fibrinogen freimacht (BENNET und VILAIRE, 1979; HAWIGER et al. 1980).

1.4 Sekretion

Durch die Anlagerung eines Agonisten an einen Rezeptor wird außer der Aggregation auch die Sekretion von Granula aus den Plättchen in Gang gesetzt.

Die Veränderung von Membranproteinen durch den Agonist-Rezeptor-Komplex (RODBELL, 1980) und die Phosphorylierung von Membranproteinen (LYONS und ATHERTON, 1979; HASLAM und LYNHAM, 1978) scheinen den Sekretionsvorgang zu beeinflussen. Dieser scheint außerdem in Zusammenhang mit dem Anteil und der Viskosität der Membranphospholipide (HIRATA und AXELROD, 1978) und der Freisetzung von intrazellulär membrangebundenem Calcium (FEINSTEIN, 1978) zu stehen.

Die Sekretion ist morphologisch durch ein Ansammeln der Granula in der Mitte der Plättchen und einer anschließenden vom Agonisten abhängigen Degranulierung gekennzeichnet (HOLMSEN, 1977).

Adrenalin, ADP und niedrige Konzentrationen von Thrombin und Kollagen setzen δ -Granula mit Serotonin, ADP und Calcium, jedoch keine λ -Granula frei. Höhere Konzentrationen von Thrombin und Kollagen rufen auch die Sekretion von λ -Granula hervor. Die Freisetzung von Plättchen-Faktor 4, β -Thromboglobulin und "platelet-derived-growth-factor" aus den α -Granula benötigt hingegen noch geringere Konzentrationen an Thrombin als zur Sekretion von δ - und λ -Granula benötigt werden (WITTE et al. 1978).

1.5 Vermittlung der Aggregation und Sekretion

Das unterschiedliche Aggregations- und Sekretionsverhalten der Plättchen auf verschiedene Stimuli hin, läßt darauf schließen, daß mehr als ein Weg vorhanden ist, über den diese Reaktionen vermittelt werden. KINLOUGH-RATHBONE et al. (1977) beschreiben bei der durch Thrombin vermittelten Sekretion einen durch ADP-Freisetzung vermittelten, einen von der Prostaglandinsynthese abhängigen und einen von beiden Mechanismen unabhängigen Weg. Für diesen dritten Weg ist ein Phospholipid, der "platelet-activating-factor" (PAF) verantwortlich (VARGAFTIG et al. 1981).

2. Calmodulin (CaM)

CHEUNG (1970) und KAKIUCHI et al. (1970) entdeckten unabhängig voneinander einen Aktivierungsfaktor der Phosphodiesterase. TEO und WANG zeigten 1973, daß er ein calciumbindendes Protein ist. Andere Arbeitsgruppen (APPLEMAN et al. 1973, CHEUNG et al. 1975, WELLS und HARDMAN, 1977) fanden, daß dieses Protein in höheren Konzentrationen als die Phosphodiesterase auftritt und in allen Geweben, auch solchen ohne Phosphodiesterase-Aktivität, zu finden ist. SMOAKE et al. (1974) und LYNCH et al. (1975) zeigten, daß das Auftreten dieses Aktivierungsfaktors in der phylogenetischen Entwicklung nicht dem der Phosphodiesterase parallel verläuft, was eine getrennte genetische Regulation der beiden Proteine vermuten läßt.

1973 beschrieben BOND und CLOUGH ein lösliches Protein als Aktivator der Ca^{2+} -Transport-ATPase in menschlichen Erythrocyten-Membranen.

GOPINATH und VINCENZI (1977) und JARRETT und PENNISTON (1977) vermuteten, daß die Aktivatoren der Phosphodiesterase und der Ca^{2+} -Transport-ATPase identisch sind, was sich in der Folge auch bestätigte.

In den letzten Jahren wurden eine ganze Reihe von Enzym- und Zellfunktionen gefunden, die dieser Aktivator moduliert und für den CHEUNG et al. 1978 den Namen "Calmodulin" geprägt hat (Tabelle 1).

Tabelle 1: Durch Calmodulin regulierte Enzyme und Zellfunktionen

	Enzym/Zellfunktion	Beschreiber
Stoffwechsel der cyclische Nucleotide	Adenylatcyclase	Brostrom et al. 1975 Cheung et al. 1975 Nagao et al. 1979
	Guanylatcyclase Phosphodiesterase	Kakiuchi et al. 1970 Cheung, 1970
Muskelkontraktion und Glycogenstoffwechsel	Myosin-"light-chain"-Kinase	Dabrowska et al. 1978 Yagi et al. 1978
	Phosphorylase-Kinase Glycogen-Synthase-Kinase	Cohen et al. 1978 Srivastava et al. 1979 Payne & Soderling, 1980
Synthese und Freisetzung von Transmittern, Hormonen und Mediatoren	Exocytose Tryptophan-5 -Monoxygenase	DeLorenzo et al. 1979 Yamauchi & Fujisawa, 1979
	Tyrosin-3 -Monooxygenase Phosphorylierung eines spezifischen Membranproteins der synaptischen Vesikel	Yamauchi & Fujisawa, 1980 Burgoyne, 1981
Zellteilung	DNA-Synthese RNA-Synthese	Chafouleas et al. 1980 Chafouleas et al. 1980
	Auf- und Abbau der Microtubuli	Marcum et al. 1978
Stoffwechsel der Prostaglandine	Phospholipase A ₂ 15-Hydroxyprostaglandindehydrogenase	Wong & Cheung, 1979 Wong et al. 1980
Synthesestoffwechsel	NAD-Kinasen	Anderson & Cormier, 1978
Ca ²⁺ -Stoffwechsel	Ca ²⁺ -Transport-ATPasen	Gopinath & Vincenzi, 1977 Jarrett & Penniston, 1977 Katz & Remtulla, 1978 Sobue et al. 1979

WATTERSON et al. gelang es 1980, die komplette Aminosäuresequenz des Calmodulins aus Rinderhirn zu bestimmen.

Calmodulin ist ein sehr hitzestabiles Protein mit 148 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 16700 Dalton. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei einem pH-Wert von 4,3 und wird durch den hohen Anteil an sauren Aminosäuren bedingt (27 Reste Glutaminsäure, 23 Reste Asparginsäure). Calmodulin enthält kein Tryptophan, Cystein und Hydroxyprolin, jedoch die seltene Aminosäure Trimethyllysin an Position 115. Das Fehlen der Aminosäuren Cystein und Hydroxyprolin bedingt eine hochflexible Tertiärstruktur, welche eine Bindung an verschiedene Rezeptorproteine ermöglicht (CHEUNG, 1980). Der Anteil von 8 Resten Phenylalanin und 2 Resten Tyrosin ist für ein charakteristisches UV-Absorptionsmuster verantwortlich (CHEUNG, 1980).

Auffallend ist die Ähnlichkeit von Calmodulin und Troponin C (ca. 70% der Aminosäuresequenz ist homolog), Parvalbumin, S-100 und intestinales Ca^{2+} -Bindungsprotein, welche insgesamt eine homologe Reihe von Ca^{2+} -Bindungsproteinen darstellen.

Calmodulin ist auch in sich selbst homolog. Teilt man es in 4 Domänen, so fällt die Ähnlichkeit von Domäne 1 und 3 bzw. 2 und 4 besonders auf. Alle Domänen besitzen eine Ca^{2+} -bindende Stelle, welche durch eine schleifenförmige Anordnung der Aminosäuren gekennzeichnet ist. Diese Ähnlichkeit der einzelnen Domänen läßt darauf schließen, daß Calmodulin schon früh in der Evolution aus zwei aufeinanderfolgenden Duplikationen eines Gens erfolgte, wobei dieses ein kleineres, etwa einer Domäne entsprechendes Vorläuferprotein, kodierte (WATTERSON et al. 1980).

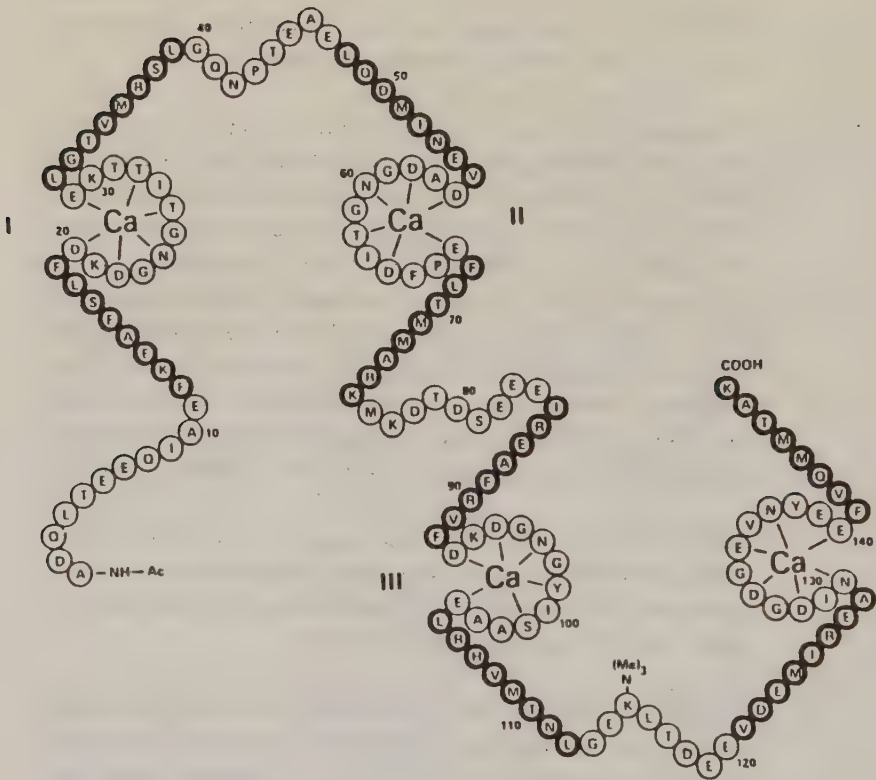


Abbildung 2: Aminosäuresequenz von Calmodulin aus Rinderhirn

A: Ala	D: Asp	E: Gm	F: Phe	G: Gly	H: His
I: Ile	K: Lys	L: Leu	M: Met	N: Asn	P: Pro
Q: Gln	R: Arg	S: Ser	T: Thr	V: Val	Y: Tyr

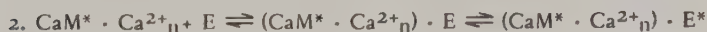
(nach KLEE et al. 1980)

Calmodulin wurde durch Trypsin in Bruchstücke gespalten. Die Bruchstücke wurden dann auf ihre Aktivität gegenüber Calmodulin-abhängigen Enzymsystemen untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Bruchstücke mit unterschiedlicher Aktivität auf ein Enzymsystem wirkten und daß auch die Potenz desselben Bruchstückes, gegenüber verschiedenen Enzymsystemen, unterschiedlich hoch war (KUZNICKI et al. 1981).

Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, daß Calmodulin auf verschiedene Weise an die von ihm aktivierten Enzyme bindet, und daß eine ubiquitäre, identische Calmodulin-bindende Untereinheit bei den Enzymen nicht vorhanden ist.

Die Struktur von Calmodulin ist in der Phylogenese gut erhalten geblieben. Calmodulin verschiedener Vertebraten besitzt annähernd die gleiche Aminosäuresequenz und verhält sich biologisch kreuzreaktiv. Geringe Abweichungen zeigt Calmodulin von Nichtvertebraten und Pflanzen, doch erkennt hier z.B. ein Antikörper gegen Calmodulin aus Rinderhirn das Calmodulin aus Baumwollsamensamen. Calmodulin konnte in allen untersuchten eukaryotischen Spezies nachgewiesen werden, jedoch aktiviert Calmodulin aus Rinderhirn auch die prokaryotische Adenylatcyclase, obwohl es in Prokaryoten nicht vorkommt (SCHIAFFI, 1981).

Voraussetzung für die Bindung von Calmodulin an ein entsprechendes Enzym, ist in jedem Fall die Anwesenheit von Ca^{2+} . Sie erfolgt in zwei jeweils reversiblen Schritten.



Hierbei steht E für ein Enzym, CaM für Calmodulin und das Sternchen * symbolisiert Konformationsänderung von Calmodulin oder den beteiligten Enzymen. Über die Stöchiometrie des aktiven $\text{CaM}^*\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes besteht noch keine Gewißheit. Die Zahl n der Ca^{2+} -Ionen beträgt bei der Aktivierung der Phosphodiesterase 4 (HUANG et al. 1981) und im Fall der Ca^{2+} -Transport-ATPase 3 (COX et al. 1982).

Wird eine Zelle durch einen Transmitter, ein Hormon oder ein Aktionspotential stimuliert, so ändert sich die Membranpermeabilität in Bezug auf Ca^{2+} . Es findet ein Ca^{2+} -Einstrom statt, der die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-7} auf 10^{-6} mol/l erhöht. Der Calcium-Anstieg in der Zelle induziert die Anlagerung von Ca^{2+} an Calmodulin und die Bildung des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes (KLEE et al. 1980 und CHEUNG, 1980).

Dieser Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex kann entweder direkt auf ein Effektor-System, z.B. Ca^{2+} -Transport-ATPase, oder indirekt auf ein Regulator-System, z.B. Protein-Kinase, einwirken. Dadurch werden sowohl die schnellen, direkten, als auch die langsamen, indirekten Reizantworten durch das Ca^{2+} -Calmodulin-System vermittelt.

Der andere "second-messenger", cyclo-AMP, scheint nur auf langsamem, indirektem Weg über die Stimulierung der Protein-Kinasen zu wirken.

Da das Ca^{2+} -Calmodulin-System auch den Stoffwechsel der cyclischen Nucleotide reguliert, besteht somit eine Koppelung zwischen den beiden "second-messengers" Ca^{2+} und cyclo-AMP (KLEE et al. 1980 und RASMUSSEN, 1970).

3. Calmodulin-beeinflußte Systeme in Thrombocyten

Es ist allgemein bekannt, daß Ca^{2+} eine entscheidende Rolle bei der Regulation physiologischer und biochemischer Prozesse der Blutplättchen spielt (DETWILER et al. 1978).

SMOAKE et al. (1974) und MUSZBEK et al. (1977) berichten, daß Thrombocyten relativ große Mengen an Calmodulin enthalten. WHITE et al. (1981) wiesen mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz die Anwesenheit von Calmodulin in den Thrombocyten nach und lokalisierten 80% davon im Cytosol. Nachfolgend sind verschiedene Systeme der Thrombocyten besprochen, bei deren Steuerung Calmodulin beteiligt ist.

3.1 Stoffwechsel der Prostaglandine

Der erste Schritt der Thromboxan-Synthese ist die Freisetzung der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure aus Membranglycerophospholipiden, welche vor allem auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert sind (PERROT et al. 1979). Für diese Freisetzung sind zwei Wege beschrieben. Auf dem ersten Weg erfolgt die Freisetzung von Arachidonsäure direkt aus einem Phospholipid durch ein Enzym, welches als Phospholipase A_2 bekannt ist (RUSSEL und DEYKIN, 1976; BILLS et al. 1977; RITTENHOUSE-SIMMONS et al. 1977).

Auf dem zweiten Weg wird zuerst durch Phospholipase C aus Phosphatidylinositol Inositoltriphosphat abgespalten (RITTENHOUSE-SIMMONS et al. 1979; MAUCO et al. 1979). Aus dem verbleibenden Diglycerid wird dann durch eine Diglycerid-Lipase Arachidonsäure freigesetzt (BELL et al. 1979; BELL und MAJERUS, 1980).

Die freie Arachidonsäure wird nun in zwei Schritten metabolisiert werden (MARCUS, 1978). Der erste Schritt ist die Umwandlung in die Prostaglandin-Endoperoxide PGG_2 und PGH_2 durch das Häm-haltige Enzym Cyclooxygenase (ROTH und SIOK, 1978). Diese Endoperoxide sind Induktoren der Plättchenaggregation und Sekretion (HAMBERG et al. 1974). Der zweite Schritt ist die Umwandlung der Endoperoxide durch das Enzym Thromboxan-Synthetase in Thromboxan A_2 , welches eine starke Aggregation und Sekretion der Plättchen hervorruft (HAMBERG et al. 1975).

Voraussetzung für die Thromboxan A_2 -Entstehung ist die Bereitstellung von Arachidonsäure, welche in der Hauptsache auf dem Weg über die Phospholipase A_2 bewerkstelligt wird. Diese Phospholipase A_2 benötigt nach WONG und CHEUNG (1979) zur Entfaltung der Enzymaktivität Ca^{2+} , dessen Wirkung durch Calmodulin vermittelt wird. Weiterhin greift Ca^{2+} -Calmodulin dadurch in den Prostaglandinstoffwechsel ein, daß es ein die Prostaglandine abbauendes Enzym, die 15-Hydroxyprostaglandinhydrogenase, hemmt (WONG et al. 1980)

3.2 Phosphorylierung der Myosin-"light-chain"-Kinase

ADELSTEIN und POLLARD (1978) und KORN (1978) berichten, daß 10-30% des gesamten Proteingehalts von Thrombocyten aus Actin- und Myosin-Molekülen besteht und diese nahezu dieselbe Struktur aufweisen, wie Actin und Myosin aus Muskelzellen. Die Fähigkeit dieser Moleküle, Spannung zu erzeugen oder sich zu verkürzen, wird als eine für die Gestaltsänderung, Sekretion und Aggregationsreaktion wichtige Eigenschaft angesehen.

ADELSTEIN und CONTI (1975) fanden, daß die Regulation der Actin-Myosin-Aktivität durch die Phosphorylierung bzw. die Dephosphorylierung der 20.000 Dalton leichten Kette des Myosin vonstatten geht.

CHACKO et al. (1977) und SOBIESZEK (1977) zeigten für die glatte Muskulatur und SCORDILIS und ADELSTEIN (1977) für Skelett-Muskulatur, daß die Phosphorylierung von Myosin notwendig ist, um die Acto-Myosin-ATPase zu aktivieren. Die Phosphorylierung der 20.000 Dalton leichten Kette des Myosin wird in der glatten Muskulatur durch die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Myosin-"light-chain"-Kinase vermittelt (HATHAWAY und ADELSTEIN, 1979).

ADELSTEIN et al. (1980) beschreibt eine vom aktiven Zentrum des Enzyms verschiedene Bindungsstelle für den Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex. Wird diese Bindungsstelle durch Proteolyse entfernt, so wird dadurch eine Ca^{2+} -Calmodulin-unabhängige Aktivität der Myosin-"light-chain"-Kinase in derselben Höhe wie durch Calmodulin selbst induziert.

Die Myosin-"light-chain"-Kinase kann durch eine cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert und damit inaktiviert werden. Nach Abspaltung des Phosphatrestes durch eine Phosphatase entfaltet das Enzym wieder seine Aktivität (ADELSTEIN und EISENBERG, 1980).

3.3 Energiestoffwechsel

Für die Plättchenreaktion sind energieabhängige Vorgänge notwendig. Um diese Energie bereitzustellen, wird im Thrombocyten Glycogen synthetisiert und bei Bedarf abgebaut. Dazu stehen die Enzyme Glycogensynthase und Glycogen-Phosphorylase zur Verfügung. Durch Phosphorylierung mittels des Enzyms Glycogensynthase-Kinase wird die Glycogensynthase gehemmt. Dagegen führt die Phosphorylierung der Glycogen-Phosphorylase durch die Phosphorylase-Kinase zu einer Aktivierung des Enzyms.

SRIVASTAVA et al. (1979) und PAYNE und SODERLING (1980) beschrieben eine Aktivitätssteigerung der Glycogensynthase-Kinase durch Ca^{2+} -Calmodulin.

Die Phosphorylase-Kinase kann sowohl durch cyclo-AMP über eine cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase als auch über Ca^{2+} in ihrer Aktivität gesteigert werden. Die Ca^{2+} -Wirkung wird durch Calmodulin vermittelt, welches hier eine Untereinheit des Holoenzym darstellt (COHEN et al. 1978). GERGELY et al. (1980) fand eine zusätzliche, reversible Ca^{2+} -abhängige Bindung eines zweiten Calmodulinmoleküls an das Protein und beschreibt in Übereinstimmung mit CHEUNG (1980) eine Verminderung der Glycogenbereitstellung durch Hemmung der Calmodulinwirkung.

3.4 Beeinflussung der Thrombocytenreaktion durch cyclo-AMP

Der "second-messenger" cyclo-AMP wird aus ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat durch die membranständige Adenylatcyclase gebildet. Er aktiviert durch Anlagerung an eine Untereinheit die Proteinkinase, die ihrerseits durch Phosphorylierung von Proteinen wirkt. Den Abbau des cyclo-AMP übernimmt die im Zytoplasma gelöste Phosphodiesterase (LÖFFLER, 1979).

SALZMAN et al. (1970) und BALL et al. (1970) fanden für verschiedene Substanzen, welche die Plättchenfunktion hemmen, eine Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels im Thrombocyten.

DE CLERK und DAVID (1981) berichteten, daß durch eine Aktivierung der Adenylatcyclase oder eine Hemmung der Phosphodiesterase die Plättchenreaktion gehemmt werden kann. Diese Autoren führten die verminderte Plättchenreaktion auf ein Absinken des Ca^{2+} -Spiegels und damit verbundenen Reduktion aller Ca^{2+} -abhängigen Vorgänge, wie z.B. der Thromboxan A_2 -Synthetase, zurück, der durch eine cyclo-AMP-bedingte Stimulierung einer Ca^{2+} -Pumpe zustande kommt. Diese speichert Ca^{2+} im endoplasmatischen Retikulum der Thrombocyten ein (KÄSER-GLANZMANN et al. 1979). Weiterhin bewirkt ein Ansteigen des cyclo-AMP-Spiegels, daß die Myosin-"light-chain"-Kinase in zunehmendem Maße durch eine cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert und damit inaktiviert wird (ADELSTEIN und EISENBERG, 1980).

WANG et al. (1980) beschrieb für Hirngewebe des Rindes und HEAD et al. (1980) für glatte Muskulatur eine Abhängigkeit der Enzyme Adenylatcyclase und Phosphodiesterase von Ca^{2+} und Calmodulin. Durch die Zellmembran einströmendes Ca^{2+} bindet sich daher zunächst an membrangebundenes Calmodulin und aktiviert die Adenylatcyclase, die ATP in cyclo-AMP umwandelt. Erst danach erreicht Ca^{2+} auch die cytoplasmatischen Calmodulinmoleküle, so daß nun die Phosphodiesterase aktiviert werden kann. Dabei reicht zu Beginn des Einstroms der vergleichsweise niedrige Ca^{2+} -Spiegel aus, um die Adenylatcyclase zu aktivieren, während die Phosphodiesterase erst bei höherem Ca^{2+} -Spiegel in Gang gesetzt wird, um die cyclo-AMP-Konzentration wieder auf Normalwerte zu senken (WANG et al. 1980).

ALVAREZ et al. (1981) besprechen die Möglichkeit einer ähnlichen cyclo-AMP-Regulation durch den Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex bei Thrombocyten.

4. Calmodulinantagonisten

Calmodulin ist wahrscheinlich der wichtigste intrazelluläre Rezeptor, der durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gekennzeichnete Botschaften an eine Vielzahl von Enzymsystemen und Zellfunktionen übermittelt.

WEISS et al. (1974) fanden, daß Trifluoperazin die Calmodulin-induzierte Stimulation der Phosphodiesterase hemmt. Nachfolgend zeigten LEVIN und WEISS (1978), daß Trifluoperazin und verwandte Substanzen Ca^{2+} -abhängig an Calmodulin binden.

In der Zwischenzeit sind eine große Zahl strukturell nicht miteinander verwandte Substanzen bekannt, die Calmodulin-inhibitorische Eigenschaften besitzen: Phenothiazine, Butyrophenone, Lokalanästhetika, Vinca-Alkaloide, Naphthalensulfonamide, Melittin, Calmidazolium und Compound 48/80 (GIETZEN, 1985).

Vor allem die Phenothiazine, speziell Trifluoperazin, wurden seither in zahlreichen Untersuchungen als Werkzeuge angewandt, um zu klären, ob Calmodulin in Ca^{2+} -abhängige zelluläre Funktionen involviert ist. Die Ergebnisse vieler dieser Studien sind fragwürdig, da man inzwischen weiß, daß Phenothiazine und andere Calmodulinantagonisten viele andere Effekte bei Konzentrationen produzieren, die denen vergleichbar sind, die die Funktion des Calmodulin hemmen (BALZER et al. 1968; GIETZEN et al. 1982; LUTHRA, 1982; GIETZEN und BADER, 1985; GIETZEN, 1985).

Die Zugehörigkeit der Calmodulinantagonisten zu verschiedenen Stoffklassen läßt darauf schließen, daß anscheinend nur geringe strukturelle Voraussetzungen für eine Wechselwirkung mit Calmodulin notwendig sind. NORMAN et al. (1979) konnten zeigen, daß die Potenz

verschiedener Stoffe zur Hemmung der Calmodulin empfindlichen Phosphodiesterase mit der Hydrophobizität der Substanzen korrelierte.

GIETZEN et al. (1983) und VAN BELLE (1984) veranschaulichten am Beispiel von Compound 48/80 und Calmidazolium, daß dies nicht die einzige die Potenz eines Calmodulininhibitors bestimmende Eigenschaft eines Stoffes sein konnte. Sie vermuten, daß zusätzlich die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Calmodulin und Inhibitor für den Antagonismus von Bedeutung ist. Die Beobachtung von WEISS et al. (1980), daß sich Trifluoperazin nicht bei pH-Werten unterhalb des pI von Calmodulin und nicht über dem pKa von Trifluoperazin an Calmodulin anlagert, bestätigt diese Interpretation.

GIETZEN (1985) beschreibt ein Modell für den Wirkungsmechanismus von Calmodulinantagonisten. Dieses geht von zwei hervorstechenden Eigenschaften des Calmodulin aus: der Azidität und der Hydrophobizität, wobei letztere durch die Ca^{2+} -Anlagerung induziert wird (LaPORTE et al. 1980, TANAKA und HIDAKA, 1980).

Allgemein kann Calmodulin als anionisches Amphiphil betrachtet werden. Es wird angenommen, daß für Calmodulin auf dem Zielenzym eine kationische amphiphile Bindungsstelle existiert. Wird diese durch Calmodulin besetzt, soll dadurch eine inhibitorische Peptidsequenz unterdrückt und damit deren Wirkung auf das aktive Zentrum des Zielenzym ausgeschaltet werden (SARKADI et al. 1980). KLEE (1980) vermutet, daß die Aktivitätssteigerung des Zielenzym durch eine Konformationsänderung (Entfaltung) bedingt wird.

Alle Calmodulinantagonisten sind bei physiologischem pH-Wert kationische Amphiphile und für die meisten wurde gezeigt, daß sie Ca^{2+} -abhängig an Calmodulin binden (LEVIN und WEISS, 1978; TANAKA und HIDAKA, 1980). Durch diese Bindung an Calmodulin, welche auf elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkung beruht, wird die Aktivierung des Zielenzym verhindert oder rückgängig gemacht. Darüber hinaus wiesen GIETZEN und BADER (1985) für die Ca^{2+} -Transport-ATPase der Erythrocyten eine direkte Beeinflussung durch die Calmodulinantagonisten nach.

Derzeit stehen eine Reihe von spezifischen Calmodulinantagonisten wie Seminalplasmin, Compound 48/80, Melittin und Calmidazolium zur Verfügung, um Calmodulin-abhängige Vorgänge an Enzymsystemen aufzuklären. Für Untersuchungen an intakten Zellen, bzw. für mögliche therapeutische Anwendungen, sind jedoch Calmodulinantagonisten mit guter Membranpermeabilität erforderlich. Aber gerade die vorgenannten, hochspezifischen Antagonisten sind aufgrund ihrer Struktur nicht in der Lage, eine biologische Membran zu passieren um in das Zellinnere zu gelangen (GIETZEN et al. 1983). Man muß in Betracht ziehen, daß hohe Spezifität und gute Membranpermeabilität möglicherweise Eigenschaften von Calmodulinantagonisten sind, die sich gegenseitig ausschließen (GIETZEN, 1985).

Die fundamentale Rolle des Calmodulin beim Informationstransfer vom Extrazellulärraum ins Cytoplasma, die in der Modulation einer Reihe vitaler zellulärer Prozesse resultiert, macht es zu einem potentiellen Ziel für pharmakologische Beeinflussungen. Jedoch wird die therapeutische Anwendbarkeit von Calmodulinantagonisten durch die Tatsache kompliziert, daß eine Blockade des ubiquitären und multifunktionellen Modulartoproteins zu zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen führen kann (GIETZEN, 1985).

Von Prozessen wie der Zellproliferation, der Relaxation der glatten Muskulatur, der Histaminfreisetzung und der Plättchenaggregation ist bekannt, daß Calmodulin auf sie regulierend einwirkt. Von einigen zur Beeinflussung dieser Vorgänge klinisch benutzten Pharmaka wird berichtet, daß sie Calmodulin-antagonistische Eigenschaften aufweisen, wobei jedoch die Frage offen bleiben muß, ob der therapeutische Effekt dieser Substanzen über den Calmodulinantagonismus erzielt wird (GIETZEN, 1985).

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Experimentelle Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Pharmaka auf die Freisetzung von Serotonin aus Thrombocyten untersucht. Hierzu mußte ein Versuchssystem etabliert werden, welches die Messung der Serotoninfreisetzung hinreichend genau möglich machte. Überdies schien es notwendig, die Thrombocyten aus ihrem Plasma zu isolieren und die Versuchsschritte in einer Pufferlösung durchzuführen, um optimal vergleichbare Ergebnisse der Pharmakon-Wirkung zu erhalten.

2. Verwendete Materialien

2.1 Blutplasma wurde freundlicherweise von der DRK-Blutspendezentrale Ulm zur Verfügung gestellt.

2.2 Pufferlösung

NaCl	155 mmol/l
HEPES	5 mmol/l (pH 7,4)
CaCl ₂	50 µmol/l
Glucose	0,1 % (w/v)

2.3 Serotonin

5 - [1,2 - ^3H (N)] - Hydroxytryptamin - Kreatininsulfat,
spezifische Aktivität 27,3 Ci/mmol

Stabilität: der Zerfall des Moleküls beträgt in den ersten 3 Monaten 3%
Fa. New England Nuclear, Boston (Mass.)

Dieses Serotonin wurde unverdünnt in allen Experimenten eingesetzt.

2.4 Scintillationsflüssigkeit

Quickszint - 212

Fa. Zinsser Analytic, Frankfurt

2.5 Kollagen

Konzentration 1 mg/ml

Fa. Horn, München

2.6 Pharmaka

Trifluoperazin

Röhm, Darmstadt

Flupentixol

Tropon-Werke, Köln

Cloxacepride und Derivate

Merckle, Blaubeuren

Calmidazolium

Janssen, Beerse (Belgien)

3. Präparation der Thrombocyten

Für die gesamten Versuche wurde nur frisch abgepresstes Plasma aus Blutspenden vom Vortag verwendet, welches von der DRK-Blutspendezentrale Ulm freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

In diesem Plasma wurde nun die Thrombocytenzahl mittels eines TOA-"platelet-counter" bestimmt. Dadurch war es möglich, die Menge an Plasma abzumessen, die nötig war, um ein definiertes Volumen mit vorgegebener Anzahl Plättchen je μl zu erhalten.

$$V_p(\text{ml}) = \frac{V_v(\text{ml}) \cdot T_v(\text{ml}^{-1})}{T_p(\text{ml}^{-1})}$$

$V_p(\text{ml})$ = benötigtes Volumen an Plasma

$V_v(\text{ml})$ = für den Versuch benötigtes Volumen an
Thrombocyten-Puffer-Lösung

$T_v(\text{ml}^{-1})$ = in $V_v(\text{ml})$ benötigte Thrombocytenzahl

$T_p(\text{ml}^{-1})$ = im Plasma vorhandene Thrombocytenzahl

Diese Plasmamenge wurde nun in graduierte (ml) Zentrifugenröhrchen gefüllt und mit $350 \times g$ 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Thrombocyten-Pellet mit einer geringen Menge (500- 1000 μl) an Pufferlösung mittels einer 1000 μl -Pipette durch mehrmaliges Ansaugen und Ausstoßen resuspendiert. Daraufhin konnte durch Hinzufügen von weiterer Pufferlösung das gewünschte Endvolumen hergestellt werden.

4. Aufnahme von Serotonin in die Thrombocyten

ELTZE (1980) beschreibt eine Methode der Serotonin-Aufnahme, in der er ^{14}C -markiertes Serotonin in einer Konzentration von $0,25 \mu\text{mol/l}$ bis $2,0 \mu\text{mol/l}$ und eine Plättchenzahl von $10^8/\text{ml}$ verwendet. An der vorliegenden Arbeit wurde eine Konzentration von $0,037 \mu\text{mol/l}$ ($27,3 \text{ Ci/mmol}$) ^3H -Serotonin gewählt, was einem Einsatz von $1 \mu\text{Ci}$ auf 1 ml Zellsuspension entspricht. Bei einer Zahl von $3 \times 10^8/\text{ml}$ präparierter Thrombocyten wurden Aufnahmen von ca. 65% der eingesetzten Aktivität gemessen (Abbildung 3).

Eine weitere Frage war es, wie die Wiederaufnahme von freigesetztem Serotonin bei der späteren Erstellung von Freisetzungs- und Hemmkurven verhindert werden konnte. WIELOSZ et al. (1976) berichteten, daß Imipramin und Chlorimipramin die Aufnahme von Serotonin in Blutplättchen verhindern. Sie fanden dabei einen IC_{50} von $0,17 \mu\text{mol/l}$ für Imipramin. TALVENHEIMO et al. (1979) entdeckten, daß Imipramin keinen Serotonin-Efflux verursacht, die Aufnahme aber inhibiert. Sie vermuteten eine Bindung des Imipramin an die Substratseite des Serotonin-Carriers, so daß ein weiterer Transport von Serotonin verhindert wird. NISHIKAWA und HIDAKA (1982) verwendeten einen Zusatz von $1 \mu\text{mol/l}$ Imipramin, um die Wiederaufnahme von Serotonin zu verhindern.

Zur Bestätigung wurde folgender Versuch unternommen:

2,5 ml Thrombocytenlösung wurde bei 37°C im Wasserbad 5 Minuten inkubiert. Dann wurden 2,5 µl ³H-Serotonin zugegeben. Als Leerwert wurden sofort 200 µl entnommen, auf 800 µl vorbereitete, eiskalte Pufferlösung verbracht und davon wieder 900 µl mit einer Vakuumfilteranlage gefiltert. Auf die gleiche Weise wurde nach 3, 6, 10, 15, 30, 40 und 60 Minuten verfahren. Die Filterpapiere werden in Szintillationsgefäße überführt und diese mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt. In ein weiteres Gefäß wurden 180 µl der Thrombocytenlösung mit ³H-Serotonin pipettiert, um die Gesamtaktivität (100 %-Marke) zu bestimmen. Um die aufnahmestoppende Wirkung zu zeigen, wurde in einem weiteren Versuch nach 10 Minuten 19 µl 100 µmol/l Imipramin-Lösung (Endkonzentration 1 µmol/l) zugesetzt und ansonsten wie vorstehend verfahren.

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, wurden ungefähr 65% des ³H-Serotonins aufgenommen, während nach dem Einsatz von Imipramin (Endkonzentration 1 µmol/l) keine weitere Serotoninaufnahme zu verzeichnen war.

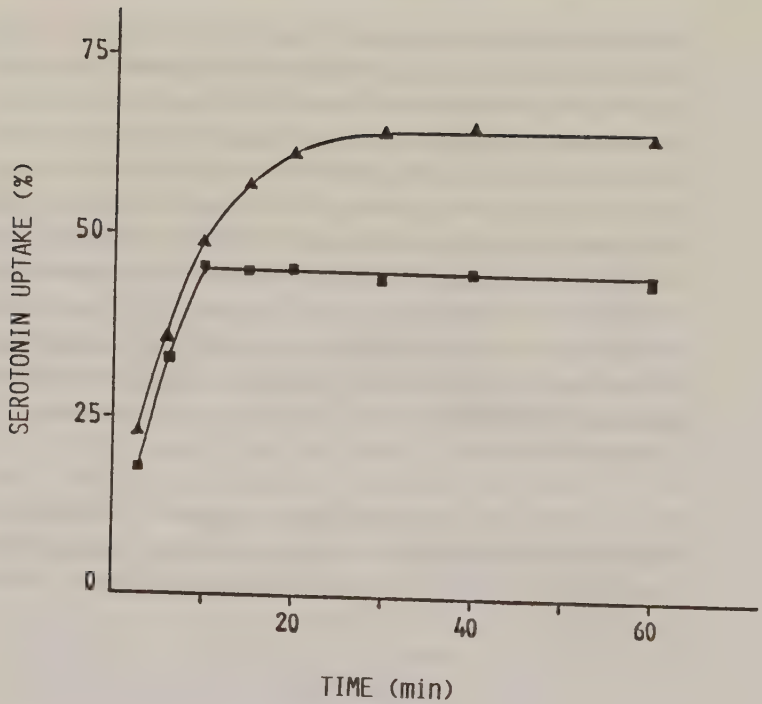


Abbildung 3: Aufnahme von ^3H -Serotonin mit und ohne Abstoppen durch Imipramin nach 10 Minuten bei 37°C .

▲ Die Sättigung der Aufnahme tritt nach ca. 30 Minuten ein. Es werden ca. 65% der Aktivität aufgenommen.

■ Nach Einsatz von Imipramin (Endkonzentration $1\text{ }\mu\text{mol}$) findet keine weitere Serotoninaufnahme mehr statt.

$100\% \hat{=} 0,037\text{ }\mu\text{mol}/3 \times 10^8 \text{ Thrombocyten}$

5. Freisetzung von Serotonin

Die Plättchenaggregation und die damit verbundene Serotoninausschüttung wurde in allen Versuchen mit einer Konzentration von 20 µg/ml Kollagen ausgelöst. Dies war ein Mehrfaches der Menge, die bei den Messungen im Aggregometer maximale Aggregation auslöste (Kollagen-Überschuß).

Die folgenden Versuche ergaben, daß die präparierten Thrombocyten während ihres langen Verweilens im Wasserbad bei 37°C (Aufnahme - Abstoppen der Aufnahme - Starten der Freisetzung - Freisetzungszeit) ihre Aktivität verloren. Aus diesem Grund wurde die Aufnahme daraufhin bei Raumtemperatur und im Plasma, worin die Thrombocyten weitaus stabiler sind als in der Pufferlösung, über 30 Minuten hin durchgeführt. Außerdem wurde die Temperatur des Wasserbades auf 30°C gesenkt.

Die nun erfolgende Messung der Freisetzung ergab, daß diese bei unbewegt im Wasserbad stehenden Thrombocyten viel zu gering war, um hinreichend genaue Ergebnisse zu erhalten.

Daraufhin wurde die Plättchenzahl auf ungefähr $5 \cdot 10^8$ je ml angehoben und eine Apparatur verwandt, die einen um die Längsachse drehbaren und durch das Wasserbad beheizbaren Aluminiumblock mit Bohrungen zur Aufnahme von 2,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen besaß. Durch die in der Geschwindigkeit variable Hin- und Rückbewegung um ca. 390° wurde der Inhalt der Eppendorfgefäße regelmäßig durchmischt.

Die rasch erfolgende Freisetzung von Serotonin und die parallel laufende Aggregation der Plättchen ergab ein neues Problem. Bei der Zusammenballung der Plättchen bildeten sich unterschiedlich große Aggregate. Wurde nun ein Aliquot entnommen, filtriert und die Thrombocyten auf dem Filter gemessen, so ergaben sich große Schwankungen in den Ergebnissen, da die Thrombocytenaggregate die Poren der Filter verstopften.

Als Lösung bot sich an, nicht das verbleibende Serotonin in den Thrombocyten, sondern durch Zentrifugieren und Messen einer bestimmten Menge des Überstandes direkt die Serotonin-Freisetzung zu bestimmen.

Das Abstoppen der Freisetzungsreaktion wurde dadurch bewerkstelligt, daß die Thrombocytenlösung auf die vierfache Menge einer im Eiswasserbad stehenden Pufferlösung (0°C) verbracht wurde.

Weiterhin mußte die optimale Zentrifugationsdauer bestimmt werden. Dazu wurde eine Serotoninaufnahme in präparierter Thrombocytenlösung durchgeführt und nach 10 Minuten durch Imipramin abgestoppt. Es wurden 200 µl dieser Lösung auf 800 µl kalte Pufferlösung verbracht und mit der Hettich-Tischzentrifuge unterschiedlich lange zentrifugiert. Dabei erwies sich eine Dauer von 2 Minuten für den Zentrifugievorgang als am günstigsten.

Als Inkubations- und Freisetzungsintervall wurden 5 Minuten gewählt. Dies erschien günstig, da in diesem Fall die Thrombocyten nur 10 Minuten der Wasserbadtemperatur ausgesetzt waren und überdies fünf in Minutenabständen gestaffelte Proben behandelt werden konnten. Während dieser Zeit bleiben die Kontrollthrombocyten mit Kollagen voll stimulierbar.

Es galt nun, die optimale Rotationsgeschwindigkeit des Aluminiumblocks zu finden, bei der nach 5 Minuten Freisetzung möglichst viel Serotonin ausgeschüttet war und sich die Kurve noch nicht in der Sättigungsphase, sondern noch im ansteigenden Teil befand.

Durch die Erstellung verschiedener Kurven wurde gefunden, daß diese Bedingungen durch die Geschwindigkeit von 4 Zyklen, d.h. 16 Durchmischungen in der Minute, erfüllt wurden.

Abbildung 4 zeigt Freisetzungskurven für stehende Thrombocyten und für sich mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 3 Zyklen, d.h. 12 Durchmischungen pro Minuten bzw. 5 Zyklen, d.h. 20 Durchmischungen pro Minuten bewegend Thrombocytenlösung.

Abbildung 5 zeigt die Freisetzung von Serotonin mit und ohne Kollagenzusatz bei einer letztlich verwendeten Geschwindigkeit von 4 Zyklen, d.h. 16 Durchmischungen pro Minuten.

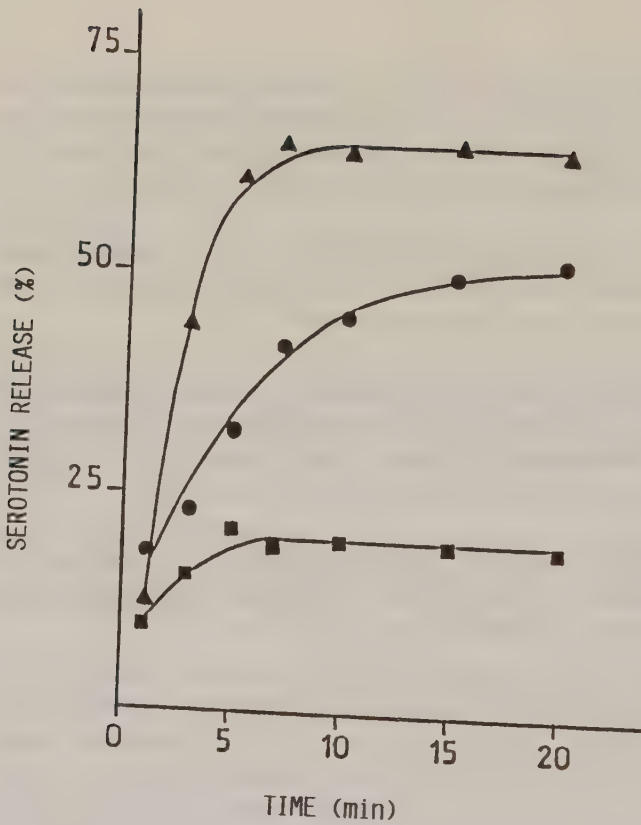


Abbildung 4: Freisetzungskurven mit verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten im Vergleich zu unbewegten Thrombocyten:

- ▲ Rotationsgeschwindigkeit: 5 Zyklen, 20 Durchmisch./min
- Rotationsgeschwindigkeit: 3 Zyklen, 12 Durchmisch./min
- unbewegte Thrombocyten

100 % $\hat{=}$ 0,024 $\mu\text{mol}/3 \times 10^8$ Thrombocyten

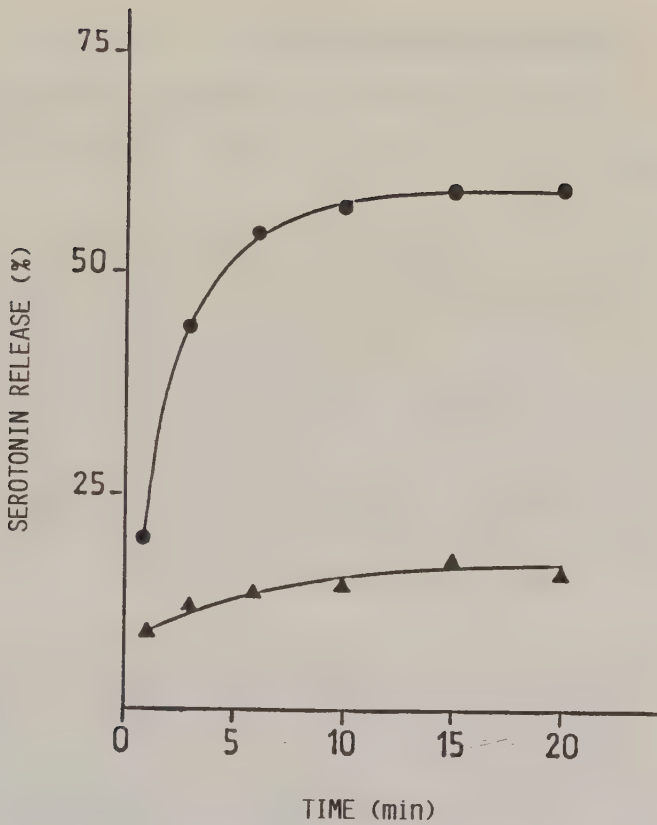


Abbildung 5: Freisetzung für eine Rotationsgeschwindigkeit von 4 Zyklen, 16 Durchmischungen/min

- mit Kollagenzusatz
- ▲ ohne Kollagenzusatz

100 % $\hat{=}$ 0,024 μ mol/ 3×10^8 Thrombocyten

6. Hemmung der Serotonin-Freisetzung

Nach Abschluß der Vorversuche konnte nun mit der Untersuchung der Pharmaka auf ihre Wirkung bezüglich der Serotonin-Freisetzung begonnen werden.

Dazu wurden 10 ml Thrombocyten-Pufferlösung mit $5,56 \times 10^8$ Plättchen pro ml für wasserlösliche Pharmaka oder 11 ml mit $5,05 \times 10^8$ Plättchen pro ml für DMSO-lösliche Pharmaka benötigt, um nach der Zugabe von 10% des Endvolumens bei wasserlöslichen bzw. von 1% bei DMSO-löslichen Pharmaka dieselbe Endkonzentration von $5 \cdot 10^8$ Plättchen zu erhalten. Die Zugabe von 10% des Endvolumens bei wasserlöslichen Substanzen war notwendig, um genügend hohe Endkonzentrationen der Stoffe im Versuchsansatz zu erhalten. Im Gegensatz dazu war es bei DMSO-löslichen Pharmaka notwendig, aufgrund des membranschädigenden Detergenzeffektes des Lösungsmittels die Zugabe so niedrig wie möglich zu halten.

Wie in III/3 beschrieben, wurde nun das benötigte Plasmavolumen bestimmt und die errechnete Menge in ein gradiertes Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden 10 μ l (=10 μ Ci) 3 H-Serotonin hinzugefügt, das Röhrchen dicht verschraubt, durchmischt und dann bei Raumtemperatur 40 Minuten belassen. Danach wurde das Plasma wie in III/3 erläutert, weiterverarbeitet. Dazu wurde eine Pufferlösung benutzt, die eine 1 μ molare Imipramin-Konzentration aufwies.

Aus der so hergestellten 10 ml (11 ml)¹ Thrombocyten-Pufferlösung wurden 10 2,2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 900 μ l (990 μ l)¹ gefüllt.

¹Mengenangaben in Klammern für DMSO-lösliche Pharmaka

In weitere 10 Eppendorf-Gefäße wurden je 10 μl = 10 μg Kollagen verbracht. Zusätzlich wurden 20 Eppendorf-Gefäße mit je 800 μl Imipramin-Pufferlösung gefüllt und in ein Eiswasserbad gestellt.

Die einzelnen Proben wurden nun folgendermaßen behandelt:

Auf 900 μl (990 μl)¹ wurden 100 μl (10 μl)¹ einer bestimmten Konzentration eines zu untersuchenden Pharmakons gegeben und in ein 30°C Wasserbad verbracht. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Freisetzung gestartet indem man 500 μl der Probe entnahm und auf die vorbereiteten 10 μl Kollagen in einem Eppendorf-Gefäß pipettierte. Dieses Gefäß, und das den Rest enthaltende, wurden nun auf den auf 30°C beheizten Aluminiumblock der mit 4 Zyklen (16 Durchmischungen) laufenden Bewegungs-Apparatur gesteckt.

Das Abstoppen der Freisetzungsreaktion geschah nach weiteren 5 Minuten dadurch, daß aus jedem Gefäß 200 μl entnommen wurden und auf jeweils 800 μl der im Eiswasser stehenden Pufferlösung (0°C) pipettiert wurden.

Die 5-Minuten-Intervalle ermöglichten es, 5 Proben in Minutenabständen gestaffelt zu bearbeiten. Dadurch war es möglich, alle 10 Proben in 2 aufeinanderfolgenden Versuchsdurchgängen zu behandeln. Die auf Eis stehenden Gefäße wurden geschlossen und 2 Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Danach wurde vom Überstand 200 μl entnommen und in Szintillationsgefäße mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit überführt. Nach einigen Stunden Abklingzeit erfolgte die Messung der Gefäße in einem β -Szintillations-counter für ein Zeitintervall von 10 Minuten je Probe.

¹Mengenangaben in Klammern für DMSO-lösliche Pharmaka

7. Berechnung der Ergebnisse

7.1 Prozentwerte

Mit dem vorbereiteten Volumen an Thrombocytenlösung war es möglich, eine Probe die nur das Lösungsmittel 100 μ l H₂O (10 μ l DMSO) enthielt und außerdem bis zu neun verschiedene Konzentrationen des Pharmakons zu testen. Durch das Überführen eines Teils der Thrombocytenlösung in ein Eppendorf-Gefäß mit Kollagen (Start der Freisetzung) und das Mitführen der verbleibenden Lösung als Kontrolle, wurden zwei Reihen von Meßwerten erhalten. Die Reihe aus den Eppendorf-Gefäßen mit Kollagen stellte diejenige Menge des ³H-Serotonins dar, die sich nach der fünf Minuten andauernden Kollagen-induzierten Freisetzung in der flüssigen Phase des Versuchsansatzes befand. Dabei stellte die ausschließlich das Lösungsmittel enthaltende Probe den durch Pharmaka unbeeinflussten Wert F_0 dar, während sich für die verschiedenen Konzentrationen der Pharmaka die Werte F_C ergaben. Analog dazu wurde in der Reihe der mitgeführten Kontrollwerte (ohne Kollagen) ein in Abwesenheit von Pharmaka erzielter Wert B_0 , der die sich immer in der flüssigen Phase befindlichen Menge des ³H-Serotonins repräsentierte und die durch die verschiedenen Pharmaka-Konzentrationen beeinflussten Werte B_C erhalten.

Durch Subtraktion des Wertes B_0 von den anderen Werten konnte nun die Freisetzung an ³H-Serotonin bestimmt werden. Dabei repräsentierte die Differenz $F_0 - B_0$ die maximale, durch Pharmaka unbeeinflusste, kollagen-induzierte Freisetzung. Die Werte $F_C - B_0$ ergaben die durch Kollagen- und Pharmakon-Wirkung freigesetzten Mengen an ³H-Serotonin und die Werte $B_C - B_0$ stellten die allein durch Pharmakon-Wirkung erzielte ³H-Serotonin-Freisetzung dar.

Die so erhaltenen Werte in "counts per minute" (cpm) waren jedoch von Präparation zu Präparation recht unterschiedlich und machten eine Umrechnung auf Prozentwerte notwendig. Dazu wurde als 100%-Marke die maximale pharmakologisch unbeeinflusste Kollagen-induzierte Freisetzung F_0-B_0 verwandt. Die Prozentwerte F für die Pharmakon- und Kollagen-bedingte und die Prozentwerte B für die allein Pharmakon-bedingte Freisetzung errechneten sich folgendermaßen:

$$F = \frac{F_C - B_0}{F_0 - B_0} \times 100 \%$$

$$B = \frac{B_C - B_0}{F_0 - B_0} \times 100 \%$$

Um die alleinige Kollagen-induzierte Freisetzung zu erhalten, wurde zudem noch für jede Konzentration die Differenz (F-B) gebildet.

7.2 Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des arithmetischen Mittels (SE)

Aus den nach 7.1 berechneten Prozentwerten der einzelnen Thrombocyten-Präparation wurden für jedes Pharmakon die Mittelwerte MW und die Standardabweichung SD als Maß der Streuung der Einzelwerte (X) um die Mittelwerte berechnet.

$$MW = \frac{\sum x}{n}$$
$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - MW)^2}{n - 1}}$$

Der Mittelwert selbst ist wiederum eine zufällige Variable, die eine Wahrscheinlichkeitsverteilung besitzt. Diese theoretische Standardabweichung des Mittelwerts wird als Standardfehler des arithmetischen Mittels (SE) bezeichnet und errechnet sich aus

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum (x - MW)^2}{n (n - 1)}}$$

8. Ergebnisse

Nachfolgend werden die Versuchsergebnisse für die jeweiligen Pharmaka tabellarisch und als Schaubild wiedergegeben.

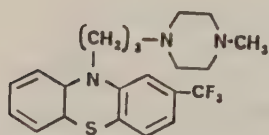
Die Tabelle enthält die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Standardfehler des arithmetischen Mittels (SE) für die gesamte Freisetzung (F), die Pharmakon-bedingte Freisetzung (B) und die Kollagen-bedingte Freisetzung (F-B). Durch n wird die Anzahl der Messungen angegeben.

Der IC_{50} -Wert gibt diejenige Konzentration eines untersuchten Pharmakons an, bei der die Freisetzung um 50% gehemmt ist. Der IC_{50} -Wert wird jeweils aus dem Schaubild entnommen.

In den Schaubildern wird die gesamte, Pharmakon- und Kollagen-bedingte Freisetzung (F) mit Dreiecken (▲), die Pharmakon-bedingte Freisetzung (B) mit Quadraten (■) und die Kollagen-bedingte Freisetzung (F-B) mit Kreisen (●) dargestellt.

Die Beladung der Thrombocyten mit Serotonin beträgt bei den folgenden Experimenten ca. $0,028 \mu\text{mol}/5 \times 10^8$ Thrombocyten. Die maximale Ausschüttung (100%-Marke der Abbildungen) liegt bei ca. $0,0097 \mu\text{mol}/5 \times 10^8$ Thrombocyten.

TRIFLUOPERAZIN



MG: 444

Lösungsmittel: aqua bidest

Tabelle 2: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Trifluoperazin

	$\mu\text{mol/l}$	1	3	10	15	20	30	50	100
F	MW	99,7	91,4	78,7	54,6	44,4	29,4	16,3	34,0
	SD	7,9	4,9	12,2	13,2	6,7	10,2	9,6	9,8
	SE	3,2	2,0	4,9	5,3	2,7	4,1	3,9	4,0
B	MW	4,9	3,0	0,7	1,7	5,6	4,6	11,5	53,2
	SD	2,7	3,0	2,1	1,2	3,8	2,1	2,9	9,8
	SE	1,1	1,2	0,8	0,4	1,5	0,8	1,1	4,0
F-B	MW	94,7	88,3	77,8	53,9	38,8	24,8	4,8	
	SD	8,5	6,9	10,4	13,4	7,8	9,2	8,7	
	SE	3,4	2,8	4,2	5,4	3,1	3,7	3,5	
	n	6	6	6	6	6	6	6	6

IC₅₀ (F) 16 $\mu\text{mol/l}$

IC₅₀ (F-B) 15 $\mu\text{mol/l}$

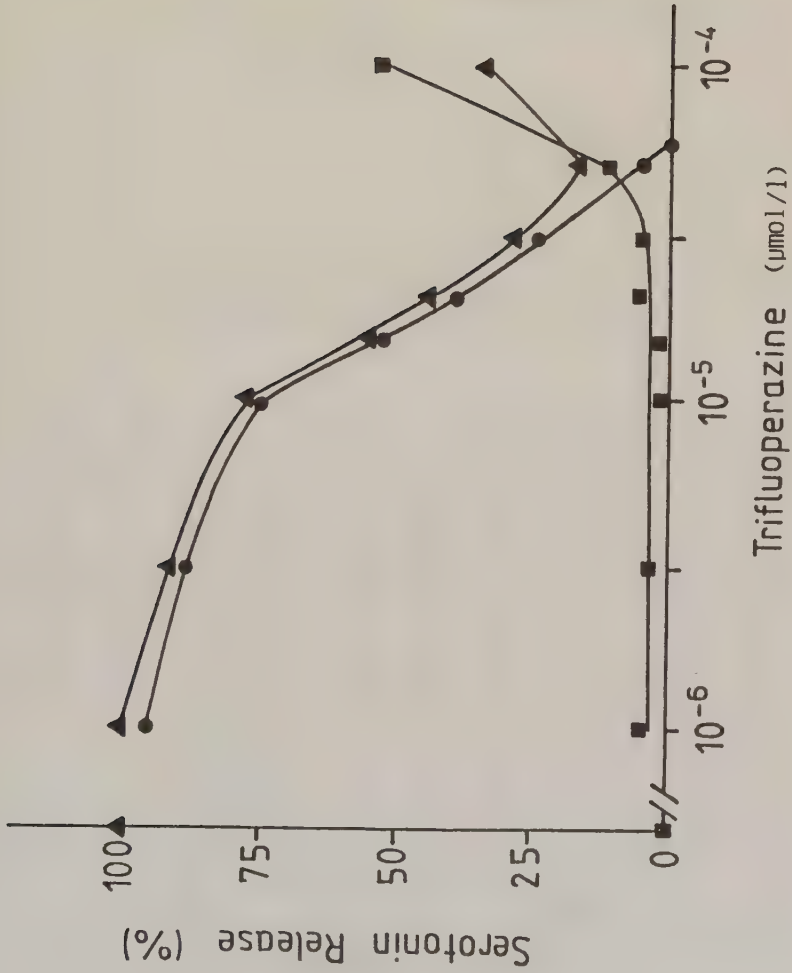
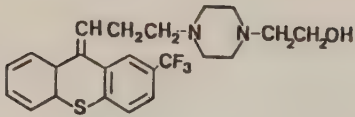


Abbildung 6: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Trifluoperazin

FLUPENTIXOL



MG: 434,5

Lösungsmittel: aqua bidest

Tabelle 3: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch trans-Flupentixol

$\mu\text{mol/l}$	0,1	0,3	1	3	10	15	20	30	50	
F	MW	96,4	94,7	91,6	78,2	38,1	41,0	35,2	34,4	64,4
	SD	6,9	5,2	8,2	9,2	12,6	8,5	6,5	7,7	30,2
	SE	3,0	2,3	3,6	4,1	5,6	3,8	2,9	3,4	13,5
B	MW	5,8	4,9	7,6	5,7	6,6	14,2	23,2	47,6	100,5
	SD	10,5	10,0	6,1	9,0	8,2	9,5	5,7	12,8	41,4
	SE	4,6	4,4	2,7	4,0	3,6	4,2	2,5	5,7	18,5
F-B	MW	90,6	89,8	84,0	72,4	31,5	26,7	11,9		
	SD	11,5	7,6	4,9	5,8	9,6	5,9	6,1		
	SE	5,1	3,3	2,1	2,5	4,2	2,6	2,7		
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

IC₅₀ (F) 7,5 $\mu\text{mol/l}$

IC₅₀ (F-B) 5,2 $\mu\text{mol/l}$

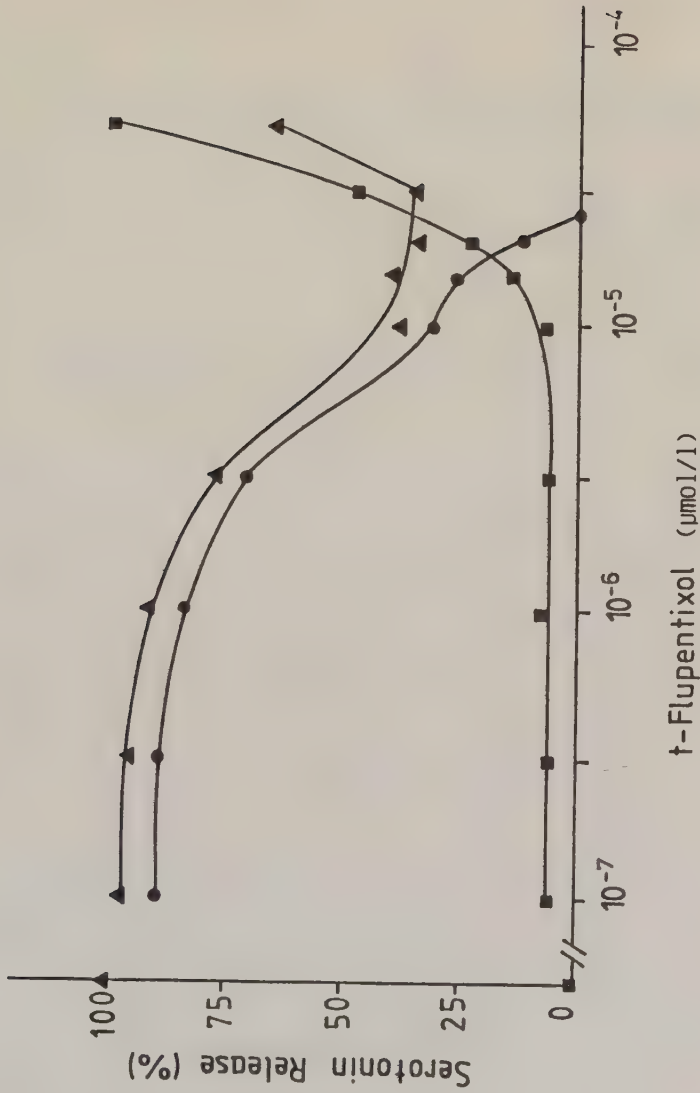
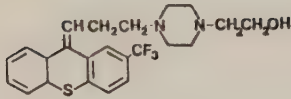


Abbildung 7: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch trans-Flupentixol

FLUPENTIXOL



MG: 434,5

Lösungsmittel: aqua bidest

Tabelle 4: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch cis-Flupentixol

$\mu\text{mol/l}$	0,1	0,3	1	3	10	15	20	30	50	
F	MW	96,6	91,4	89,8	81,2	48,8	40,9	40,7	42,6	67,8
	SD	7,2	11,1	10,0	21,0	12,7	12,4	12,0	14,9	25,2
	SE	2,9	4,5	4,0	8,5	5,1	5,0	4,8	6,0	10,2
B	MW	18,2	16,1	16,4	17,1	23,3	30,2	34,2	54,8	113,2
	SD	14,7	9,5	10,4	13,1	13,9	17,1	17,3	22,7	44,5
	SE	6,0	3,8	4,2	5,3	5,6	6,9	7,0	9,2	18,1
F-B	MW	78,4	75,3	73,3	64,0	25,5	10,6	6,4		
	SD	13,2	15,3	15,2	26,3	15,9	13,9	14,3		
	SE	5,3	6,2	6,2	10,7	6,4	5,6	5,8		
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	

IC₅₀ (F) 8,0 $\mu\text{mol/l}$

IC₅₀ (F-B) 5,0 $\mu\text{mol/l}$

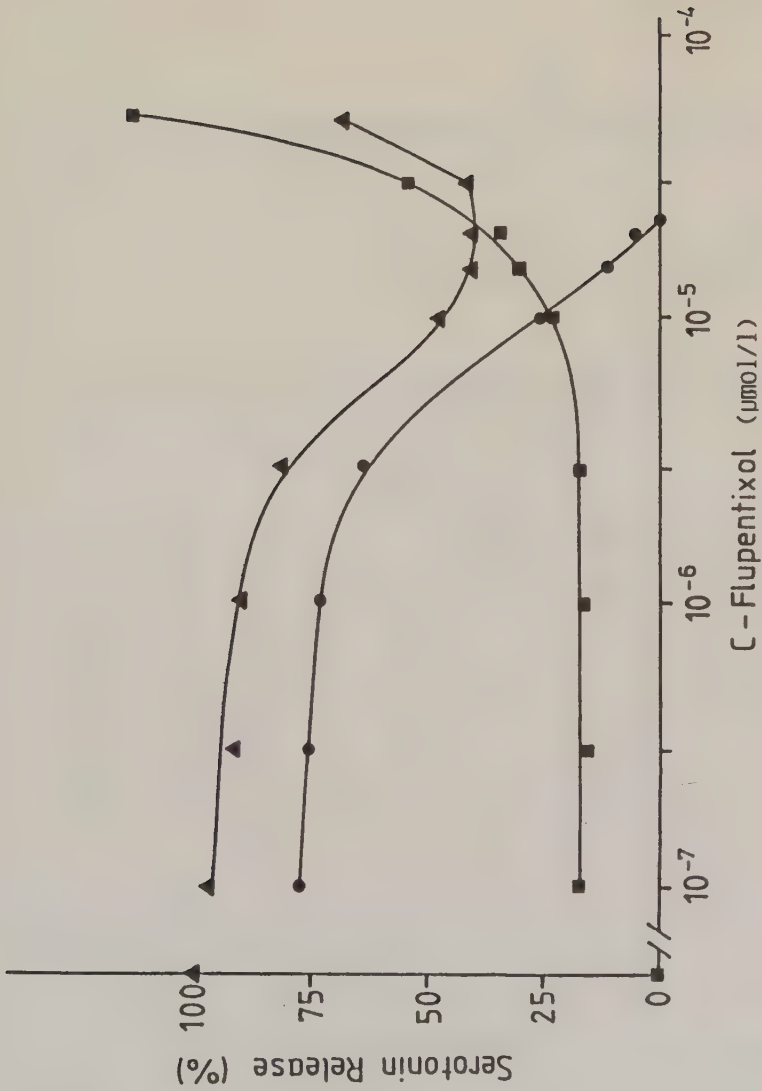
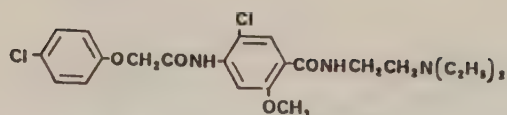


Abbildung 8: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch cis-Flupentixol

CLOXACEPRIDE



MG: 468,4

Lösungsmittel: aqua bidest

Tabelle 5: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Cloxacepride

$\mu\text{mol/l}$		1	3	10	15	20	50	100	300
F	MW	97,2	90,2	69,1	43,0	38,0	40,1	38,2	69,3
	SD	4,3	3,6	17,4	15,4	14,5	17,0	12,3	22,0
	SE	1,7	1,4	7,1	6,2	5,9	6,9	5,0	8,9
B	MW	8,6	6,5	8,4	12,6	12,5	27,7	49,5	81,1
	SD	3,4	3,7	4,2	5,1	5,1	8,9	14,6	32,6
	SE	1,3	1,5	1,7	20,0	2,0	3,6	5,9	13,3
F-B	MW	88,5	83,6	60,6	30,4	25,5	12,3		
	SD	4,8	5,6	19,9	15,3	11,9	9,2		
	SE	1,9	2,2	8,1	6,2	4,8	3,7		
n		6	6	6	6	6	6	6	6

IC₅₀ (F) 14,0 $\mu\text{mol/l}$

IC₅₀ (F-B) 11,5 $\mu\text{mol/l}$

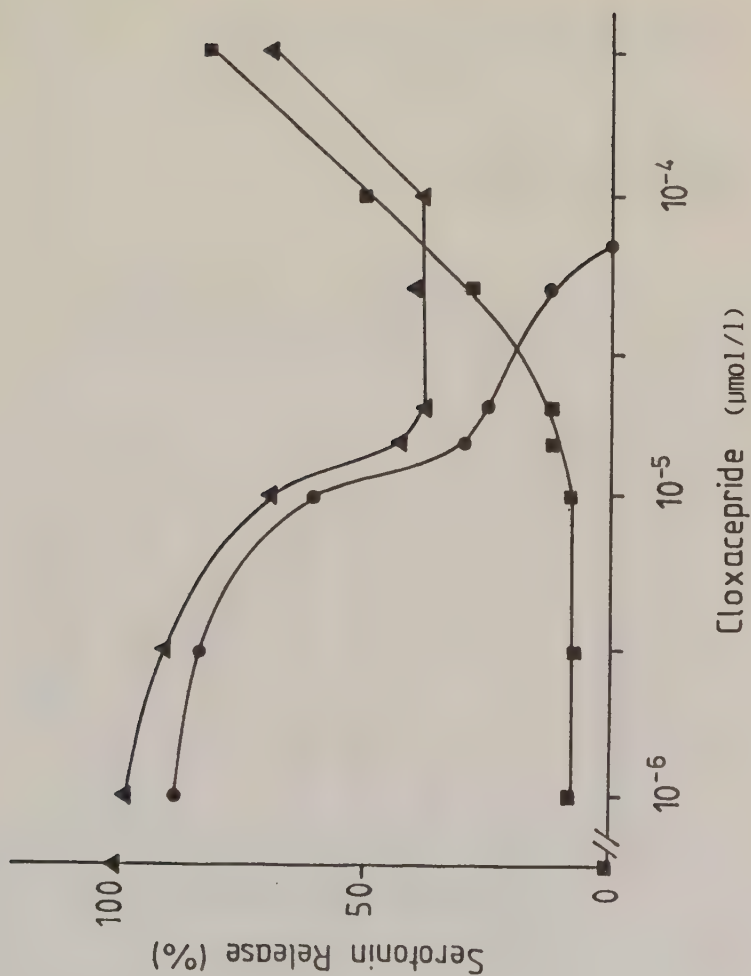
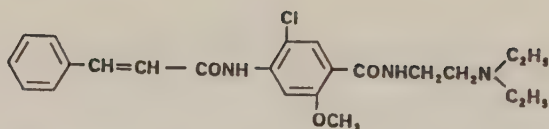


Abbildung 9: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Cloxacepride

ML 1234



MG: 429,95

Lösungsmittel: DMSO

Tabelle 6: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1234

	$\mu\text{mol/l}$	10	30	50	70	100	200	300	400
F	MW	97,3	90,8	83,0	66,3	37,5	34,4	36,3	63,1
	SD	4,7	12,1	7,4	6,5	8,5	15,6	8,6	14,7
	SE	1,9	4,9	3,0	2,6	3,4	6,3	3,5	6,0
B	MW	6,9	3,4	7,2	5,4	11,3	35,3	88,7	136,7
	SD	4,0	6,0	1,8	4,8	5,0	5,5	17,3	20,8
	SE	1,6	2,4	0,7	1,9	2,0	2,2	7,0	8,4
F-B	MW	90,4	87,4	75,8	60,9	26,1			
	SD	8,5	8,5	6,8	9,1	8,1			
	SE	3,4	3,4	2,7	3,7	3,3			
	n	6	6	6	6	6	6	6	6

IC₅₀ (F) 80 $\mu\text{mol/l}$

IC₅₀ (F-B) 76 $\mu\text{mol/l}$

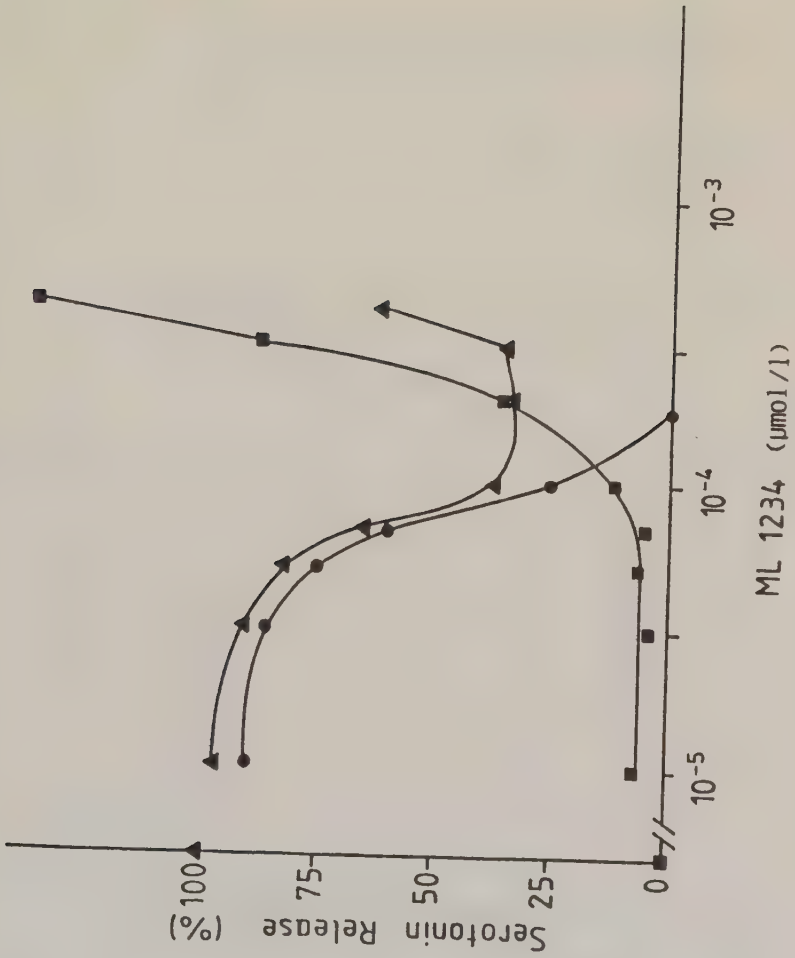
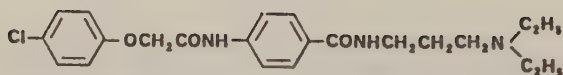


Abbildung 10: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1234

ML 1257



MG: 403,9

Lösungsmittel: DMSO

Tabelle 7: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1257

		10	30	50	70	100	150	200	300
F	MW	95,7	86,2	78,1	68,8	58,8	60,8	59,3	71,0
	SD	4,9	9,1	8,9	12,1	16,6	17,0	26,1	31,5
	SE	2,0	3,7	3,6	4,9	6,7	6,9	10,6	12,8
B	MW	6,7	6,0	6,2	8,6	14,9	32,9	46,7	83,1
	SD	6,0	3,0	5,5	6,2	8,7	20,6	21,3	36,6
	SE	2,4	1,2	2,2	2,5	3,5	8,4	8,6	14,9
F-B	MW	88,9	80,1	71,8	60,1	43,9	27,0	12,5	
	SD	6,1	11,2	11,1	13,3	18,8	24,6	14,7	
	SE	2,4	4,5	4,5	5,4	7,6	10,0	6,0	
	n	6	6	6	6	6	6	6	6

IC₅₀ (F) max. Hemmung 40% bei 100 µmol/l

IC₅₀ (F-B) 88 µmol/l

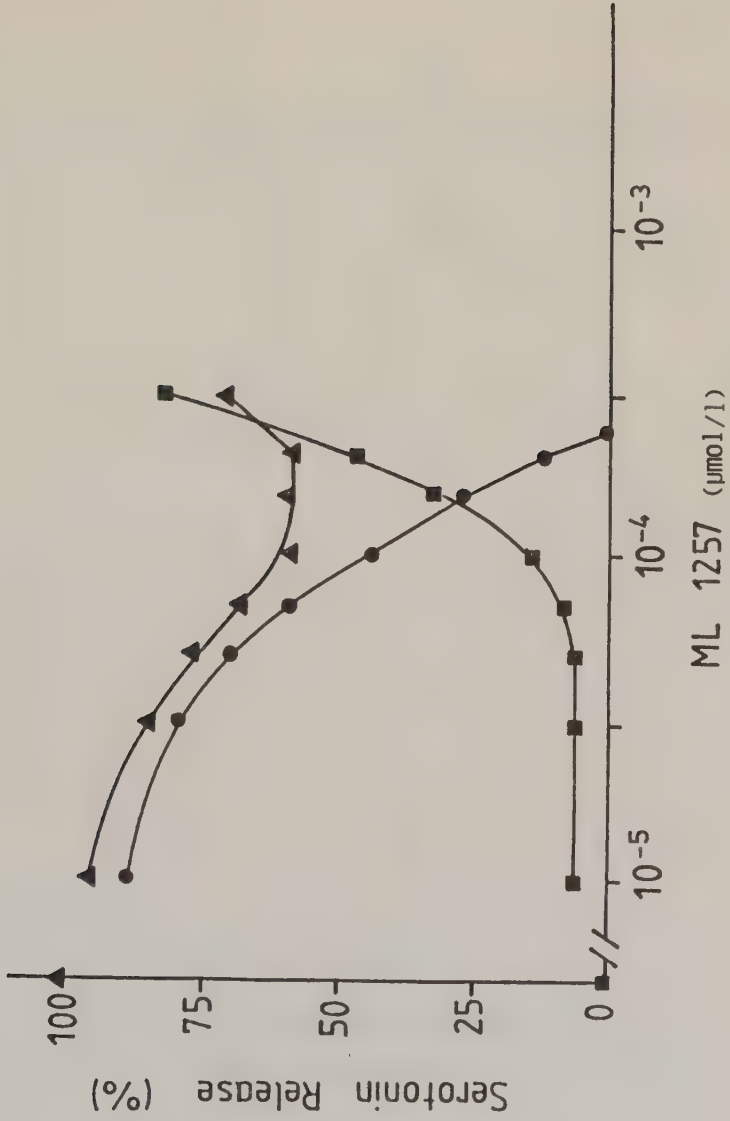
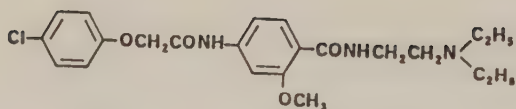


Abbildung 11: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1257

ML 1301



MG: 433,94

Lösungsmittel: DMSO

Tabelle 8: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1301

	$\mu\text{mol/l}$	1	3	10	30	50	70	100	200	300
F	MW	95,0	87,6	81,7	70,1	58,2	65,2	62,4	96,1	116,2
	SD	6,4	5,8	8,5	7,6	9,5	15,8	12,6	32,0	30,4
	SE	2,6	2,3	2,5	2,2	2,8	4,7	3,7	9,6	9,1
B	MW	11,4	10,0	10,0	11,6	16,6	24,3	32,7	99,7	159,3
	SD	3,1	2,9	3,7	5,8	7,3	10,8	14,7	35,5	62,6
	SE	1,2	1,1	1,1	1,7	2,2	3,2	4,4	10,7	18,8
F-B	MW	83,6	77,5	70,8	58,5	41,6	40,9	27,6		
	SD	8,3	4,2	10,6	8,7	9,7	15,5	14,1		
	SE	3,3	1,7	3,1	2,6	2,9	4,6	4,2		
	n	6	6	11	11	11	11	11	11	11

IC₅₀ (F) max. Hemmung 38% bei 50 $\mu\text{mol/l}$

IC₅₀ (F-B) 39 $\mu\text{mol/l}$

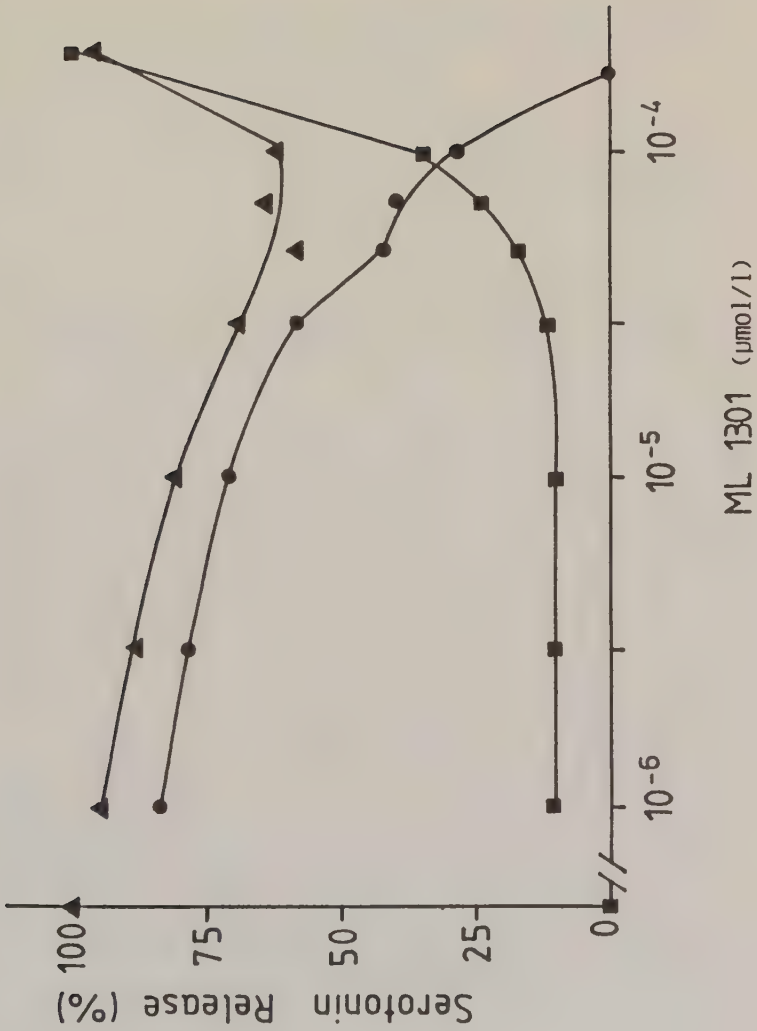
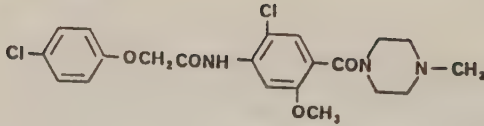


Abbildung 12: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1301

ML 1389



MG: 489,35

Lösungsmittel: DMSO

Tabelle 9: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1389

	$\mu\text{mol/l}$	0,3	1	3	10	30	100	300	1000
F	MW	95,6	93,5	87,7	70,2	55,8	52,0	55,6	69,6
	SD	10,5	9,4	7,7	13,2	28,5	18,6	14,9	25,0
	SE	3,9	3,5	2,9	4,9	10,7	7,0	5,6	9,4
B	MW	14,9	12,0	5,4	8,4	17,5	13,2	43,4	64,1
	SD	13,7	11,3	5,5	5,8	8,2	6,6	20,5	23,8
	SE	5,1	4,2	2,0	2,1	3,0	2,4	7,7	8,9
F-B	MW	80,7	81,4	82,3	61,7	38,3	38,8	12,1	5,5
	SD	15,8	9,0	9,0	14,5	31,2	19,4	15,0	12,9
	SE	5,9	3,4	3,4	5,4	11,7	7,3	5,6	4,8
	n	7	7	7	7	7	7	7	7

IC₅₀ (F) max. Hemmung 47% bei 100 $\mu\text{mol/l}$

IC₅₀ (F-B) 15 $\mu\text{mol/l}$

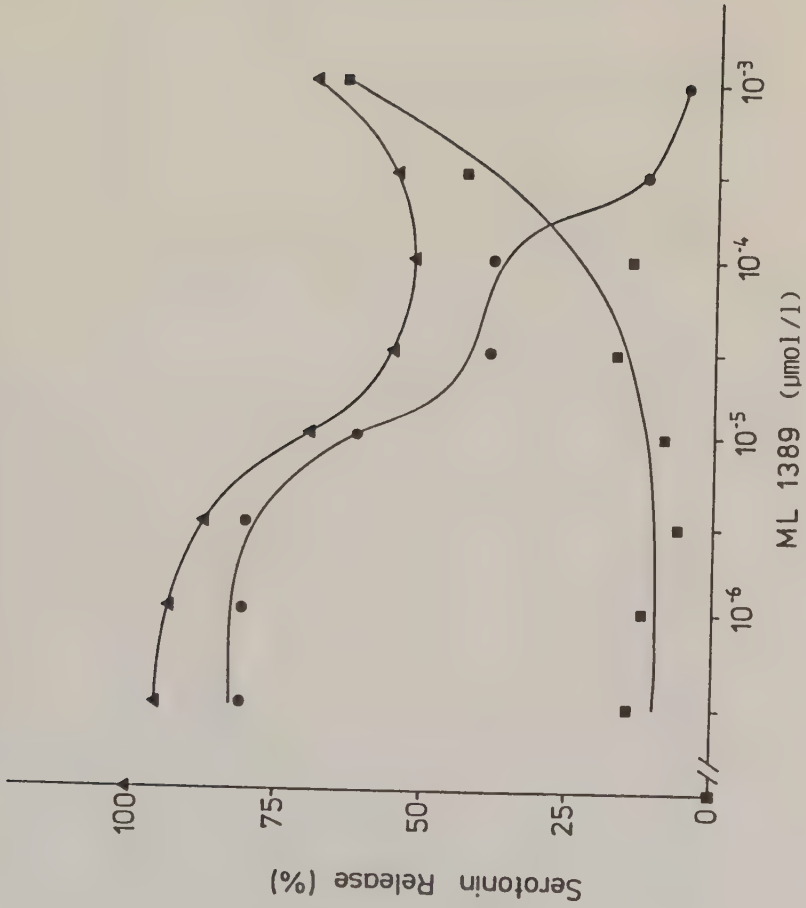
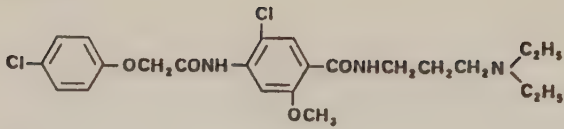


Abbildung 13: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1389

ML 1412



MG: 482,42

Lösungsmittel: aqua bidest

Tabelle 10: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1412

$\mu\text{mol/l}$	1	3	7	10	15	20	30	50	100	
F	MW	93,4	89,1	76,8	59,9	36,2	31,3	25,9	23,9	37,1
	SD	5,9	4,6	9,4	11,6	4,8	4,3	6,5	7,9	14,7
	SE	2,4	1,8	3,8	4,7	1,9	1,7	2,6	3,2	6,0
B	MW	8,8	7,4	7,1	8,0	10,4	13,9	18,9	31,6	59,9
	SD	7,0	4,9	4,5	6,1	5,8	5,8	7,6	15,4	27,5
	SE	2,8	2,0	1,8	2,4	2,3	2,3	3,1	6,2	11,2
F-B	MW	84,6	81,6	69,7	51,8	25,7	17,4	6,9		
	SD	10,1	9,5	10,4	16,4	9,6	6,3	9,6		
	SE	4,1	3,8	4,2	6,6	3,9	2,5	3,9		
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	

IC₅₀ (F) 11,5 $\mu\text{mol/l}$

IC₅₀ (F-B) 10,0 $\mu\text{mol/l}$

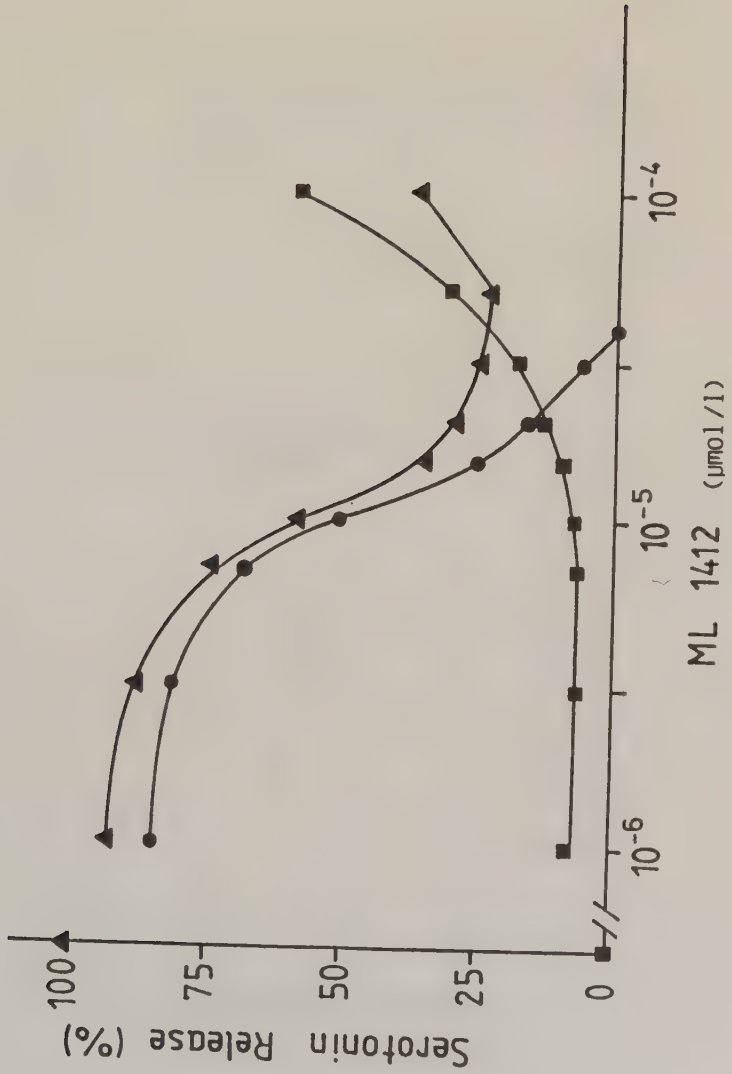
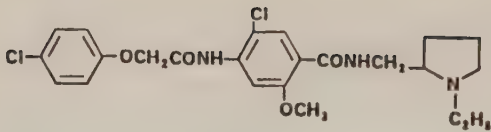


Abbildung 14: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1412

ML 1423



MG: 517,4

Lösungsmittel: aqua bidest

Tabelle 11: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus
Thrombocyten durch Substanz ML 1423

$\mu\text{mol/l}$		1	3	10	15	20	30	50	70	100
F	MW	99,4	92,2	67,5	50,8	37,2	27,5	21,2	25,7	36,9
	SD	5,1	9,9	22,3	26,8	17,6	7,8	8,4	16,4	23,9
	SE	2,0	4,0	9,1	10,9	7,1	3,1	6,6	9,7	
B	MW	9,7	7,7	3,2	7,5	10,3	18,3	31,2	44,8	73,5
	SD	9,4	8,7	4,9	9,8	9,0	15,9	26,6	33,1	65,5
	SE	3,8	3,5	2,0	4,0	3,6	6,4	10,8	13,5	26,7
F-B	MW	89,6	84,5	64,2	43,3	26,8	9,1			
	SD	12,8	18,2	24,4	29,6	24,6	13,1			
	SE	5,2	7,4	9,9	12,0	10,0	5,3			
	n	6	6	6	6	6	6	6	6	6

IC₅₀ (F) 15 $\mu\text{mol/l}$

IC₅₀ (F-B) 13 $\mu\text{mol/l}$

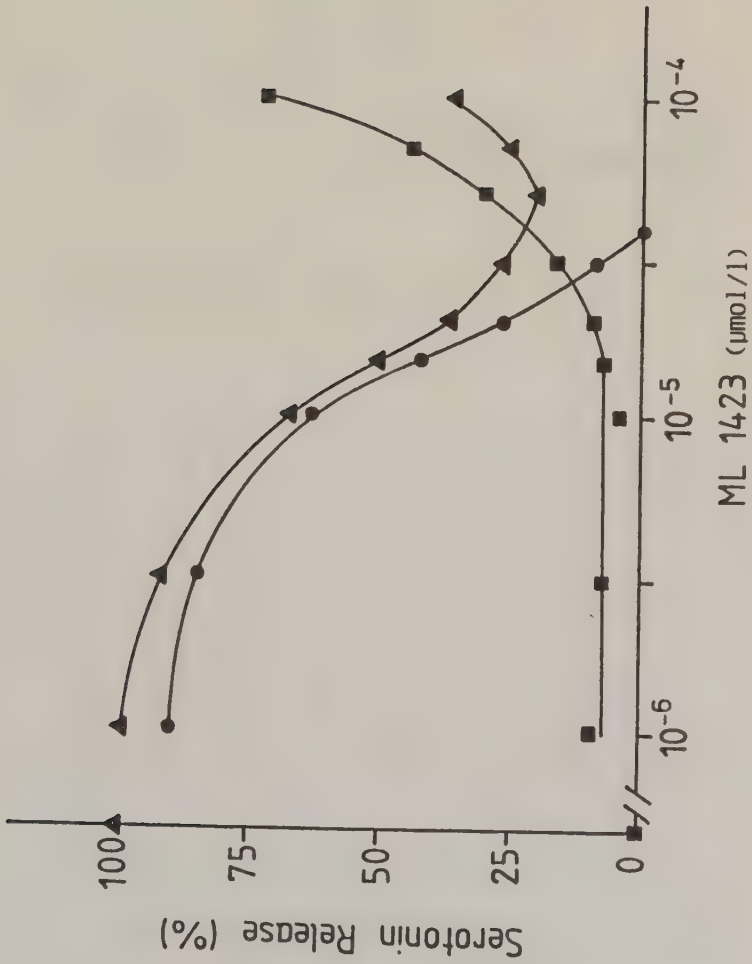
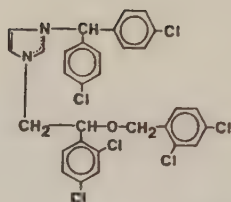


Abbildung 15: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Substanz ML 1423

CALMIDAZOLIUM



MG: 688

Lösungsmittel: DMSO

Tabelle 12: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Calmidazolium

$\mu\text{mol/l}$	0,1	0,3	1	3	10	15	20	
F	MW	94,7	91,1	93,0	92,8	108,1	103,8	126,4
	SD	11,3	12,2	15,9	8,3	17,1	19,1	65,6
	SE	4,2	4,6	6,0	3,1	6,5	8,5	29,3
B	MW	13,9	9,5	6,9	12,3	22,0	44,1	90,4
	SD	9,8	7,4	6,1	8,5	14,4	31,1	80,6
	SE	3,7	2,7	2,3	3,2	5,4	13,9	36,0
F-B	MW	80,8	81,6	86,0	80,5	86,0	59,6	36,0
	SD	13,7	16,9	16,3	7,4	12,9	23,8	14,9
	SE	5,1	6,3	6,1	2,7	4,8	10,6	6,6
n	7	7	7	7	7	5	5	

Eine Hemmung der Gesamtfreisetzung tritt nicht ein.

IC₅₀ (F-B) 13 $\mu\text{mol/l}$

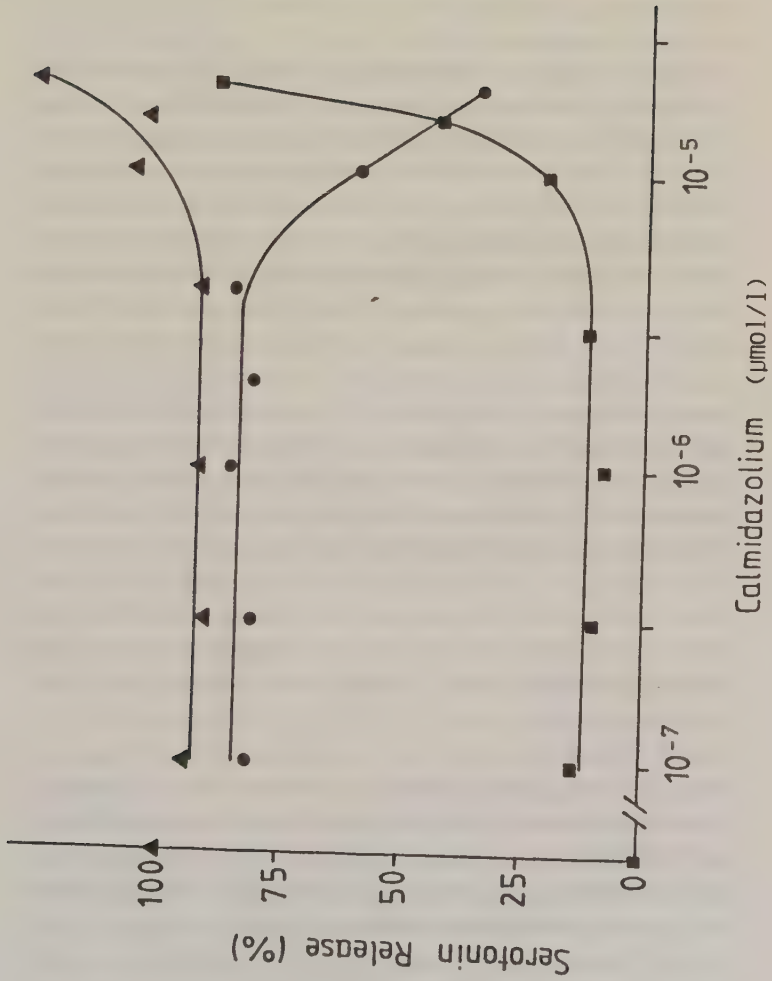


Abbildung 16: Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Calmidazolium

IV DISKUSSION

Bei Untersuchungen an Thrombocyten stellten WHITE und RAYNOR (1980) eine Hemmung der Aggregation durch Trifluoperazin und NISHIKAWA und HIDAKA (1982) eine Hemmung der Aggregation und Serotoninsekretion durch Naphthalensulfonamide fest. Aus diesen Versuchen wurde eine Beteiligung des Calmodulins an der Exocytose von Serotonin abgeleitet. Dabei wurden diese Calmodulinantagonisten bezüglich ihrer Spezifität überschätzt, da sie wie alle membrangängigen Stoffe auch Calmodulin-unabhängige Systeme beeinflussen (GIETZEN, 1985).

In der vorliegenden Arbeit sollte durch Untersuchung weiterer Stoffe die Hypothese untersucht werden, ob Calmodulin in Exocytosevorgänge der Blutplättchen involviert ist. Dazu wurden außer Trifluoperazin noch Calmidazolium, Flupentixol in cis- und trans-Form, Cloxacepride und sechs Derivate des letzteren verwendet.

Hierbei sollte Calmidazolium eine negative Kontrolle bilden und keine Effekte ausüben, da es, obwohl es einen der potentesten Calmodulinantagonisten darstellt, aufgrund seiner Struktur nicht membranpermeabel ist.

Cloxacepride stellt ein Kondensationsprodukt aus Metoclopramid und Chlorphenoxyessigsäure dar. SANCHEZ-DELGADO und METZ (1983) und FRIEDRICH et al. (1984) zeigten, daß es die Histamin- und Serotonin-Ausschüttung aus Mastzellen, einen Exocytosevorgang ähnlich der Serotonin-Ausschüttung aus Thrombocyten, hemmt.

Überdies wurde Cloxacepride und seine Derivate in unserer Arbeitsgruppe auf seine Calmodulin-antagonistische Wirkung an bekannten Calmodulin-abhängigen Systemen, wie der Phosphodiesterase und der Ca^{2+} -Transport-ATPase untersucht und MAILE (1984, unveröffentlichte Ergebnisse) testete diese und einige weitere Substanzen auf ihre Hemmwirkung hinsichtlich der Thrombocytenaggregation im Licht-Transmissions-Aggregometer.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden tabellarisch und in Schaubildern dargestellt. Dabei wiesen die Freisetzungskurven mehr oder weniger denselben Verlauf auf. Die Gesamtfreisetzung an Serotonin wurde mit zunehmender Konzentration des Pharmakons geringer, um dann bei noch höheren Konzentrationen wieder anzusteigen. Bei dem Pharmakon Calmidazolium war kein Abfall, sondern nur ein Anstieg der Serotoninfreisetzung im Bereich $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ festzustellen. Weiterhin auffallend war der rasche Anstieg der Pharmakon-bedingten Serotoninfreisetzung, der im selben Bereich stattfand, wie der Wiederanstieg der Gesamtfreisetzung und in allen Fällen steiler als diese verlief. So wurde für die Substanzen Calmidazolium und ML 1389 ein Konvergieren und für alle anderen Pharmaka sogar ein Schneiden der beiden Kurvenverläufe erhalten.

Der Wiederanstieg bzw. Anstieg der Serotoninfreisetzung über die maximale, durch Pharmaka beeinflusste Kollagen-induzierte Freisetzung hinaus, ist vermutlich auf einen Detergenzeffekt der Pharmaka zurückzuführen, der eine Membranschädigung und bei sehr hohen Konzentrationen den Tod der Thrombocyten durch Zellyse zur Folge hat. Aufgrund der Tatsache, daß sowohl die Proben zur Ermittlung der Gesamtfreisetzung, als auch die zur Ermittlung der Pharmakon-bedingten Freisetzung genau gleich behandelt wurden, muß man annehmen, daß die langsamer verlaufende Membranschädigung bei denen der Gesamtfreisetzung auf die Anwesenheit von Kol-

lagen zurückzuführen ist. Dabei wäre denkbar, daß ein Teil des Pharmakons an die Kollagenfibrillen gebunden wird und so die freie Konzentration an Pharmakon niedriger ist als in der Kontrollprobe. Alternativ könnte auch die durch Kollagen verursachte Gestaltsänderung der Thrombocyten deren Membran gegen den Detergenzeffekt der Pharmaka unempfindlicher machen.

Durch Konvergenz der beiden Kurven wurde der Verlauf der zusätzlich durch Differenzbildung erhaltenen Kurve F-B, welche der alleinigen Kollagen-induzierten Freisetzung entsprechen sollte, bei höheren Konzentrationen so verfälscht, daß bei fehlender oder geringer Hemmung der Gesamtfreisetzung im Bereich der Zellschädigung eine starke Hemmung der Kollagen-induzierten Freisetzung vorgetauscht wurde. Diese Beobachtung steht auch im Einklang mit den für die Aggregation von MAILE (1984, unveröffentlichte Ergebnisse) gemessenen Werten im Licht-Transmissions-Aggregometer. So fand sie zum Beispiel für Calmidazolium eine IC_{50} -Wert von $15 \mu\text{mol/l}$ für die Hemmung der Thrombocytenaggregation. Meinen Untersuchungen zufolge findet aber gerade in diesem Bereich die Pharmakon-bedingte Thrombocytenschädigung statt, während eine Serotonin-Sekretionshemmung, die einer Aggregationshemmung parallel laufen sollte, nicht zu beobachten war. Im folgenden sollen deshalb zum Vergleich mit anderen Systemen nur noch die IC_{50} -Werte der Gesamtfreisetzung herangezogen werden.

Die Gesamtfreisetzung an Serotonin wurde wie aus Tabelle 13 ersichtlich, außer durch Calmidazolium durch alle untersuchten Substanzen gehemmt. Dabei erwies sich das Psychopharmakon Flupentixol in cis- und trans-Form als potenteste Substanz. Der nahezu deckungsgleiche Kurvenverlauf, sowie der lediglich um den Faktor 1.07 unterschiedliche IC_{50} -Wert zeigen, daß zumindest für diese Substanz die Hemmwirkung an keine Stereospezifität gebunden ist.

Weiterhin scheint auf den ersten Blick die fehlende Hemmwirkung des Calmidazoliums, welches als potenter Calmodulinantagonist bekannt ist (Phosphodiesterase: $IC_{50} = 0,2 \mu\text{mol/l}$; Ca^{2+} -Transport-ATPase: $IC_{50} = 0,35 \mu\text{mol/l}$) zu signalisieren, daß der Hemmung der Serotoninfreisetzung ein Calmodulin-unabhängiger Prozeß zugrunde liegt. Zieht man aber die Struktur des Calmidazoliums als quartäre Ammoniumverbindung, die damit verbundene Unfähigkeit die Thrombocytenmembran zu passieren, und die für membranpermeable Pharmaka erhaltenen Hemmwirkungen in Betracht, so muß ein im Blutplättchen lokalisierter Angriffspunkt für die Hemmung der Serotoninfreisetzung angenommen werden. Die fehlende Hemmwirkung des Calmidazoliums schließt deshalb eine Beteiligung des Calmodulin an dem Serotonin-Freisetzungs-Prozeß nicht aus.

In der Tabelle 13 wurden die in dieser Arbeit ermittelten IC_{50} -Werte mit denen von bekannten Calmodulin-abhängigen Systemen (Phosphodiesterase und Ca^{2+} -Transport-ATPase) verglichen. Bei diesem Vergleich wurde eine weitgehende Übereinstimmung in der Reihenfolge der inhibitorischen Potenz der Stoffe für die verschiedenen Prozesse festgestellt.

Tabelle 13: Hemmwirkung der untersuchten Pharmaka auf verschiedene Systeme

Substanz	Hemmung der Ca^{2+} -Transport-ATPase *	Hemmung der Phosphodiesterase *	Hemmung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten
	IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Trifluoperazin	9	10	16
trans-Flupentixol	-	-	7,5
cis-Flupentixol	-	-	8
Cloxacepride	20	10	14
ML 1234	50	70	81
ML 1257	300 (29)	300 (37)	100 (40)
ML 1301	300	200	50 (38)
ML 1389	300 (10)	300 (5)	100 (47)
ML 1412	10	6	11,5
ML 1423	25	20	15
Calmidazolium	0,35	0,2	keine Hemmung

Die Werte in Klammern geben die maximale inhibitorische Potenz in Prozent an.

(* GIETZEN, unveröffentlichte Ergebnisse)

Dies bedeutet letztlich, daß die Calmodulin-inhibitorische Wirkung der Cloxacepride-Derivate mit der Serotonin-Freisetzungshemmenden Wirkung verknüpft ist. Es kann also mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß Calmodulin in den Serotonin-Freisetzungsmechanismus involviert ist. Eine weitere, genauere Abklärung dieser Annahme wäre möglich, wenn es gelänge, einen spezifischen Antagonisten wie Compound 48/80 oder Seminalplasmin, ein neu entdecktes Calmodulin-antagonistisches Protein aus Samenplasma (GIETZEN und GALLA, 1985), durch die intakte Membran in die Thrombocyten zu transportieren und seine Wirkung zu messen.

NISHIKAWA und HIDAKA (1982) untersuchten die Bindungsaffinität von Naphthalensulfonamid-Derivaten zu Calmodulin. Hierbei fanden sie, daß die Stärke der Bindung an Calmodulin und parallel dazu die inhibitorische Potenz mit steigender Länge der Aminoalkylkette der Naphthalensulfonamide zunahm und zusätzlich an einen Chlorrest am Naphthalenring gebunden war.

Ausgehend von Cloxacepride (IC_{50} Wert = $14,0 \mu\text{mol/l}$) wurde durch Verlängerung der Alkylkette des Metoclopramid um einen Kohlenstoff die Substanz ML 1412 erhalten, welche eine höhere Potenz (IC_{50} -Wert = $11,5 \mu\text{mol/l}$) aufwies. Die durch Entfernung des Chlorrestes aus dem Metoclopramidringes erhaltene Substanz ML 1301 erwies sich als erheblich weniger potent. Es wurde lediglich eine Hemmung von 38% bei einer Konzentration von $50 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

Diese Ergebnisse, die sich mit den von NISHIKAWA und HIDAKA (1982) gewonnenen Erkenntnissen decken, verstärken zusätzlich die Annahme, daß Calmodulin in den Serotonin-Freisetzungsprozeß involviert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich außerdem in das von GIETZEN et al. (1982a) beschriebene Modell für die Wirkung von Calmodulinantagonisten einbeziehen, welches eine Bindung aufgrund elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen zwischen Calmodulin und Antagonist annimmt.

Die für die Bindung an Calmodulin benötigte positive Ladung wird bei Cloxacepride durch das im Metoclopramidrest enthaltene sekundäre Amin repräsentiert. Wird diese positive Ladung, wie in Substanz ML 1423 geschehen, durch eine Ringstruktur abgeschirmt, verringert sich die inhibitorische Potenz des Pharmakons. Auf die durch Verlängerung der Alkylkette und damit verbundenen Zunahme der Lipophilie bedingte Steigerung der Hemmwirkung, wie bei Cloxacepride und ML 1412 beobachtet, wurde bereits hingewiesen. Betrachtet man nun die durch Dechlorierung aus Cloxacepride entstandene Substanz ML 1301 oder die durch Abspaltung des Chlorrestes und der Methoxygruppe aus ML 1412 entstandene Substanz ML 1257, so kann der enorme Wirkungsverlust zumindest teilweise durch eine Abnahme der Lipophilie erklärt werden.

Die Strukturunterschiede zwischen Cloxacepride und ML 1234 (Entfernung eines Chlor- und eines Sauerstoffatoms aus dem Chlorphenoxyessigsäurerest und Einführung einer Doppelbindung) sind zu groß um eine Aussage über den genauen Grund des Wirkungsverlustes treffen zu können.

Abschließend sollen noch einmal alle Punkte zusammengefaßt werden, die die Annahme rechtfertigen, daß Calmodulin in den Serotonin-Freisetzungsprozeß involviert ist. Dabei wäre als erstes die Hemmwirkung zu nennen, die die untersuchten Calmodulinantagonisten auf die Serotonin-Freisetzung ausüben.

Die fehlende inhibitorische Wirkung des Calmidazoliums muß hierbei als Zeichen auf einen intrazellulären Wirkort und somit als weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des Calmodulins gesehen werden. Außerdem wird beim Vergleich der erhaltenen IC_{50} -Werte der Serotonin-Freisetzungs-Hemmung mit den IC_{50} -Werten bekannter Calmodulin-abhängiger Systeme eine weitgehende Übereinstimmung in der Reihenfolge der inhibitorischen Potenzen beobachtet. Als letzter Punkt kann angeführt werden, daß dieselben strukturellen Veränderungen, die bei den Naphthalensulfonamiden die Bindung an Calmodulin und die Potenz als Calmodulin-Inhibitoren verändern, in gleichem Maß die Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten Cloxacepride-Derivate auf die Serotonin-Freisetzung beeinflussen.

V ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit mit dem Titel: **"Beeinflussung der Serotonin-Freisetzung aus Thrombocyten durch Calmodulinantagonisten"** sollte abgeklärt werden, ob die Serotonin-Freisetzung aus Blutplättchen durch Calmodulinantagonisten gehemmt wird, ob der Hemmwirkung eine Stereospezifität zugrunde liegt und ob Calmodulin in den Release-Prozeß der Thrombocyten involviert ist. Außerdem sollten noch anhand von Cloxacepride und seinen Derivaten Struktur-Wirkungs-Beziehungen erkannt werden.

Dazu wurde ein Versuchssystem entwickelt, in dem es durch Verwendung von ^3H -markiertem Serotonin möglich war, die auf einen Kollagen-Reiz ausgeschüttete Menge an Serotonin zu bestimmen.

Die hiermit erzielten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Alle untersuchten Calmodulinantagonisten, mit Ausnahme von Calmidazolium, üben einen Hemmeffekt auf die Serotonin-Freisetzung aus den Thrombocyten aus.
- 2) Die fehlende Hemmwirkung des Calmidazoliums ist auf die durch seine Struktur bedingte Unfähigkeit eine intakte Membran zu passieren zurückzuführen. Dies weist auf einen intrazellulären Wirkort der anderen Pharmaka hin.
- 3) Die Pharmaka cis-Flupentixol und trans-Flupentixol weisen einen nahezu deckungsgleichen Kurvenverlauf auf und die beiden IC_{50} -Werte unterscheiden sich lediglich um den Faktor 1,07. Dies weist darauf hin, daß den Wirkeffekten keine Stereospezifität zugrunde liegt.

- 4) Der Hemmeffekt, den alle untersuchten membranpermeablen Pharmaka ausüben, die fehlende Wirkung des Calmidazoliums und der Vergleich der Reihenfolge der inhibitorischen Potenzen der untersuchten Substanzen auf die Serotonin-Freisetzung mit denen auf bekannte Calmodulin-abhängige Systeme (Phosphodiesterase, Ca^{2+} -Transport-ATPase) lassen darauf schließen, daß Calmodulin mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Serotonin-Freisetzungs-Prozeß involviert ist.
- 5) Ausgehend von Cloxacepride wird bei Verlängerung der Alkylkette des Metoclopramid eine Zunahme der Hemmwirkung beobachtet (ML 1412), während die durch die Abspaltung des Chlorrestes aus dem Metoclopramidring erhaltene Substanz ML 1301 weniger potent ist.

S U M M A R Y

The goals of the present study entitled **"Effects of Calmodulin-Antagonists on Serotonin Release from Thrombocytes"** were to ascertain whether calmodulin-antagonists are capable of inhibiting the release of serotonin from blood platelets, to determine whether stereospecificity is involved in the inhibition, and to investigate structure-function relationships using cloxacepride and a series of its structural variants.

To this end an experimental system was developed using ^3H -labeled serotonin, which made possible the measurement of the amount of serotonin released after a collagen stimulus.

The results may be summarized as follows:

- 1) All investigated calmodulin-antagonists, with the exception of calmidazolium, exerted an inhibitory effect on serotonin release from thrombocytes.
- 2) The lack of inhibition by calmidazolium can be explained by its inability to cross the intact cell membrane due to structural considerations. This would indicate an intracellular site of action for the other investigated drugs.
- 3) The drugs cis-flupentixol and trans-flupentixol reveal nearly superimposable inhibition curves, and the IC_{50} values differ only by a factor 1.07. This indicates that the inhibitory effects do not involve stereospecificity.

- 4) The inhibitory effects of all investigated membrane-permeable drugs, the lack of an effect with calmidazolium, and the comparison of inhibitory potencies of the investigated drugs with their ability of inhibit well-known calmodulin dependent systems (Phosphodiesterase, Ca^{2+} -transport-ATPase) all lead to the conclusion that with high probability calmodulin is involved in the serotonin release process.
- 5) With respect to clocacepride, an elongation of the metoclopramide alkyl chain results in enhanced inhibitory potency (ML 1412), while removal of the chlorine atom from the metoclopramide ring (ML 1301) reduces it.

VI L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Adelstein, R.S.; Conti, M.A.
Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity
Nature **256**: 597-598, 1975
2. Adelstein, R.S.; Conti, M.A.; Pato, M.D.
Regulation of myosin-light-chain-kinase by reversible phosphorylation and calcium-calmodulin
Ann. N.Y. Acad. Sci. **356**: 142-150, 1980
3. Adelstein, R.S.; Eisenberg, E.
Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction
Ann. Rev. Biochem. **49**: 921-956, 1980
4. Adelstein, R.S.; Pollard, T.D.
Platelet Contractile Proteins
Progress in Hemostasis and Thrombosis **4**: 37-58, 1978
5. Alvarez, R.; Taylor, A.; Fazzari, J.J.; Jakobs, J.R.
Regulation of cyclic AMP metabolism in human platelets
Mol. Pharmacol. **20**: 302-309, 1981
6. Anderson, J.M.; Cormier, M.J.
Calcium-dependent regulator of NAD-Kinase in higher plants
Biochem. Biophys. Res. Commun. **84**: 595-602, 1978
7. Appleman, M.M.; Thompson, W.J.; Russel, T.R.
Cyclic nucleotide phosphodiesterases
Adv. Cyclic Nucl. Res. **3**: 65-98, 1973
8. Ball, G.; Brereton, G.G.; Fulwood, M.; Ireland, D.M.; Yates, P.
Effect of prostaglandin E₁ alone and in combination with theophylline or aspirin on collagen-induced platelet aggregation and on platelet nucleotides including adenosine 3':5'-cyclic monophosphate
Biochem. J. **120**: 709-718, 1970
9. Balzer, H.; Makinose, M.; Hasselbach, W.
The inhibition of the sarcoplasmatic calcium pump by prenylamine, reserpine, chlorpromazine and imipramine
Arch. Pharmacol. Exp. Pathol. **260**: 444-455, 1968

10. Bell, R.L.; Kennerey, D.A.; Stanford, N.; Majerus, P.W.
Diglyceride Lipase: a pathway for arachidonate release from human platelets
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 3238-3241, 1979
11. Bell, R.L.; Majerus, P.W.
Thrombin-induced hydrolysis of phosphatidylinositol in human platelets
J. Biol. Chem. **255**: 1790-1792, 1980
12. Bennet, J.S.; Vilaire, G.
Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine
J. Clin. Invest. **64**: 1393-1401, 1979
13. Bills, T.K.; Smith, J.B.; Silver, M.J.
Selective release of arachidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to thrombin
J. Clin. Invest. **60**: 1-6, 1977
14. Bond, G.H.; Clough, D.L.
A soluble protein activator of ($Mg^{2+} + Ca^{2+}$) - dependent ATPase in human red cell membranes
Biochim. Biophys. Acta **323**: 592-599, 1973
15. Brostrom, C.O.; Huang, Y.C.; Breckenridge, B.M.; Wolff, D.J.
Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**: 64-68, 1975
16. Burgoyne, R.D.
The loss of muscarinic acetylcholine receptors in synaptic membranes under phosphorylating conditions is dependent on calmodulin
FEBS Lett. **127**: 144-148, 1981
17. Chacko, S.; Conti, M.A.; Adelstein, R.S.
Effect of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and Ca^{2+} regulation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 129-133, 1977
18. Chafouleas, J.G.; Bolton, W.E.; Boyd III, A.E.; Dedman, J.R.; Means, A.R.
Changes in calmodulin (CaM) levels during the cell cycle (Abstract)
J. Cell Biol. **87**: 325, 1980

19. Cheung, W.Y.
Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase: demonstration of an activator
Biochem. Biophys. Res. Commun. **38**: 533-538, 1970
20. Cheung, W.Y.
Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation
Science **207**: 19-27, 1980
21. Cheung, W.Y.; Bradham, L.S.; Lynch, T.J.; Lin, Y.M.; Tallant, E.A.
Protein activator of 3':5'-nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase
Biochem. Biophys. Res. Commun. **66**: 1055-1062, 1975
22. Cheung, W.Y.; Lynch, T.J.; Wallace, R.W.
An endogenous Ca^{2+} -dependent activator protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase
Adv. Cyclic Nucl. Res. **9**: 233-251, 1978
23. Cohen, P.; Burchell, A.; Foulkes, J.G.; Cohen, P.T.W.; Vanaman, T.C.; Nairn, A.C.
Identification of the Ca^{2+} -dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase
FEBS Lett. **92**: 287-293, 1978
24. Cox, J.M.; Comte, M.; Stein, E.A.
Activation of human erythrocyte Ca^{2+} -dependent Mg^{2+} -activated ATPase by calmodulin and calcium: Quantitative analysis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 4265-4269, 1982
25. Dabrowska, R.; Sherry, J.M.F.; Aramatoria, D.K.; Hartshorne, D.J.
Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard
Biochemistry **17**: 253-258, 1978
26. DeClerk, F.; David, J.L.
Pharmacological control of platelet and red blood cell function in the microcirculation
J. Cardiovascular Pharmacol. **3**: 1388-1412, 1981
27. DeLorenzo, R.J.; Freedman, S.D.; Yohe, W.B.; Maurer, S.C.
Stimulation of Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release and presynaptic nerve terminal protein phosphorylation by calmodulin and a calmodulin-like protein isolated from synaptic vesicles
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 1838-1842, 1979

28. Detwiler, T.C.; Charo, J.F.; Feinman, R.D.
Evidence that calcium regulates platelet function
Thromb. Haemostasis. **40**: 207-211, 1978
29. Eltze, M.
The effects of propidine und budipine on ^{14}C -5-Hydroxytryptamine uptake and release by human blood platelets
Drug. Res. **30(II)**; **Nr. 7**: 1129-1134, 1980
30. Feinberg, H.; Michel, H.; Born, G.V.R.
Determination of the fluid volume of platelets by their separation through silicone oil
J. Lab. Clin. Med. **84**: 926-934, 1974
31. Feinstein, M.B.
The role of calcium in blood platelet function. In:
Weiss, G.B. ed.
Calcium and Drug Action, 1st. ed., p. 197-239
New York: Plenum Press 1978
32. Friedrich, G.; Haas, R.; Metz, G.
Inhibitory effect of cloxacepride on compound 48/80-induced histamine and serotonin release from rat mast cells
Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapic **267**: 264-268, 1984
33. Gaardener, A.; Jonsen, J.; Laland, S.; Hellem, A.; Owren, P.A.
Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets
Nature **192**: 531-532, 1961
34. Gergely, P.; Castle, A.G.; Crawford, N.
Platelet phosphorylase kinase activity and its regulation by the calcium-dependent regulatory protein calmodulin
Biochim. Biophys. Acta **612**: 50-55, 1980
35. Gietzen, K.
Pharmacological regulation of calmodulin's activity. In:
Bader, H.; Gietzen, K.; Rosenthal, J.; Rüdell, R. und Wolf, H.-U., eds.
Intracellular Calcium Regulation
Manchester: Manchester University Press, 1985 in press

36. Gietzen, K.; Adamczyk-Engelmann, P.; Wüthrich, A.J.; Konstantinova, A.; Bader, H.
Compound 48/80 is a selective and powerful inhibitor of calmodulin-regulated functions
Biochim. Biophys. Acta **736**: 109-118, 1983
37. Gietzen, K.; Bader, H.
Effects of calmodulin antagonists on calcium-transport-ATPase. In: Hidaka, H. and Harthorne, H.J. eds.
Calmodulin Antagonists and cellular physiology, pp. 347-362
New York: Academic Press, 1985
38. Gietzen, K.; Galla, H.-J.
Seminalplasmin: An endogenous calmodulin antagonist
Biochem. J. **230**: 277-280, 1985
39. Gietzen, K.; Sadorf, I.; Bader, H.
A model for the regulation of the calmodulin-dependent enzymes erythrocyte calcium-transport-ATPase and brain phosphodiesterase by activators and inhibitors
Biochem. J. **207**: 541-548, 1982a
40. Gietzen, K.; Wüthrich, A.; Bader, H.
Effects of microtubular inhibitors on plasma membrane calmodulin-dependent Ca^{2+} -transport-ATPase
Mol. Pharmacol. **22**: 413-422, 1982
41. Gopinath, R.M.; Vincenzi, F.F.
Phosphodiesterase activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of (Ca^{2+} - Mg^{2+}) ATPase
Biochem. Biophys. Res. Commun. **77**: 1203-1209, 1977
42. Gryglewski, R.J.; Korbut, R.; Ocetkiewicz, A.
Generation of prostacyclin by lungs in vivo and its release into the arterial circulation
Nature **273**: 765-767, 1978
43. Hamberg, M.; Svensson, J.; Samuelsson, B.
Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**: 2994-2998, 1975

44. Hamberg, M.; Svensson, J.; Wakatayashi, T.; Samuelsson, B.
Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that
cause platelet aggregation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**: 345-349, 1974
45. Haslam, R.J.; Lynham, J.A.
Relationship between phosphorylation of blood platelet proteins and
secretion of platelet granule constituents. Effects of different inhibitors
Thromb. Res. **12**: 619-628, 1978
46. Hathaway, D.R.; Adelstein, R.S.
Human platelet myosin-light-chain-kinase requires the calcium-binding
protein calmodulin for activity
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 1653-1657, 1979
47. Hawiger, J.; Parkinson, S.; Timmons, S.
Prostacyclin inhibits mobilization of fibrinogen-binding sites on
human ADP and thrombin-treated platelets
Nature **283**: 195-197, 1980
48. Head, J.F.; Birnbaum, R.J.; Kaminer, B.
Calmodulin activated phosphodiesterase from vertebrate smooth muscle
Ann. N.Y. Acad. Sci. **356**: 33-35, 1980
49. Hirata, F.; Axelrod, J.
Enzymatic methylation of phosphatidylethanolamine increases
erythrocyte membrane fluidity
Nature **275**: 219-220, 1978
50. Holmsen, H.
Prostaglandin endoperoxide-thromboxane synthesis and dense granule
secretion as positive feedback loops in the propagation of platelet
responses during "the basic platelet reaction"
Thromb. Haemost. **38**: 1030-1041, 1977
51. Huang, C.Y.; Chau, V.; Chock, P.B.; Sharma, R.K.
Mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase:
Requirement of the binding of four Ca^{2+} to calmodulin for activation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**: 871-874, 1981

52. Jarrett, H.W.; Penniston, J.T.
Partial purification of the Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase activator from human erythrocytes: Its similarity to the activator of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
Biochem. Biophys. res. Commun. **77**: 1210-1216, 1977
53. Käser-Glanzmann, R.; Gerber, E.; Lüscher, E.F.
Regulation of the intracellular calcium level in human blood platelets: Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate dependent phosphorylation of a 22 000 dalton component in isolated calcium-accumulating vesicles
Biochim. Biophys. Acta **558**: 344-347, 1979
54. Kakiuchi, S.; Yamazaki, R.; Nakajima, H.
Properties of a heatstable phosphodiesterase activating factor isolated from brain extract.-Studies on cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase
Proc. Jap. Acad. **46**: 587-592, 1970
55. Katz, S.; Remtulla, M.A.
Phosphodiesterase protein activator stimulates calcium transport in cardiac microsomal preparations enriched in sarcoplasmic reticulum
Biochem. Biophys. Res. Commun. **83**: 1373-1379, 1978
56. Kinlough-Rathbone, R.L.; Packham, M.A.; Reimers, H.-J.; Cazenave, J.-P.; Mustard, J.F.
Mechanism of platelet shape change, aggregation and release induced by collagen, thrombin or A 23, 187
J. Lab. Clin. Med. **90**: 707-719, 1977
57. Klee, C.B.
Calmodulin: The coupling factor of the two second messengers Ca^{2+} and cAMP. In:
Thomas, Podesta, Gordon, eds.
Protein phosphorylation and bio-regulation, pp. 61-69
Basel: Karger-Verlag, 1980
58. Klee, C.B.; Crouch, T.H.; Richman, P.G.
Calmodulin
Ann. Rev. Biochem. **49**: 489-515, 1980
59. Korn, E.D.
Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (A. Review)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 588-599, 1978

60. Kuznicki, J.; Graborek, Z.; Brzeska, H.; Drabikowski, W.; Cohen, P.
Stimulation of enzyme activities by fragments of Calmodulin
FEBS Lett. **130**: 141-145, 1981
61. LaPorte, D.C.; Wierman, B.M.; Storm, D.R.
Calcium induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin
Biochemistry **19**: 3814-3819, 1980
62. Leonhardt, H.
Blut, blutbildende Organe und freie Zellen des Bindegewebes. In:
Leonhardt, H. ed
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, 5. Auflage: 137-172
Stuttgart: Thieme-Verlag, 1977
63. Levin, R.M.; Weiss, B.
Inhibition by trifluoperazine of calmodulin-induced activation of
ATPase activity of rat erythrocyte
Neuropharmacology **19**: 169-174, 1980
64. Levin, R.M.; Weiss, B.
Specificity of the binding of trifluoperazine to the calcium-dependent
activator of phosphodiesterase and to a series of other calcium-binding
proteins
Biochim. Biophys. Acta **540**: 197-204, 1978
65. Löffler, G.
Bedeutung des 3', 5'-cAMP für die Regulation des Glycogenstoffwechsels. In:
Löffler, G.; Petrides, P.E.; Weiss, L.; Harper, H.A. eds
Physiologische Chemie, 2. Auflage, Seite 335-337
Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1979
66. Luthra, M.
Trifluoperazine inhibition of calmodulin-sensitive Ca^{2+} -ATPase and
calmodulin-insensitive (Na^{+} + K^{+})- and Mg^{2+} -ATPase activities of human
and rat red blood cells
Biochim. Biophys. Acta **692**: 271-277, 1982
67. Lynch, T.J.; Tallant, E.A.; Cheung, W.Y.
Separate genetic regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase
and its protein activator in cultured mouse fibroblasts
Biochem. Biophys. Res. Commun. **63**: 967-970, 1975

68. Lyons, R.M.; Atherton, R.M.
Characterization of a platelet protein phosphorylated during the thrombin-induced release reaction
Biochemistry **18**: 544-552, 1979
69. Maile, K.
Dissertation in Vorbereitung, 1984
70. Marcum, M.; Dedman, J.R.; Brinkley, B.R.; Means, A.R.
Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 3771-3775, 1978
71. Marcus, A.J.
The role of lipids in platelet function with particular reference to the arachidonic acid pathway
J. Lipid Res. **19**: 793-826, 1978
72. Mauco, G.; Chap, H.; Douste-Blazy, L.
Characterization and properties of a phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C) from platelet cytosol
FEBS Lett. **100**: 367-370, 1979
73. Moncada, S.; Korb, R.; Bunting, S.; Vane, J.R.
Prostacyclin is a circulating hormone
Nature **273**: 767-768, 1978
74. Muszbek, L.; Kuznicki, J.; Szabo, T.; Drabikowski, W.
Troponin C-like protein of blood platelets
FEBS Lett. **80**: 308-312, 1977
75. Nachmias, V.; Sullender, J.; Asch, A.
Shape and cytoplasmic filaments in control and lidocaine-treated human platelets
Blood **50**: 39-53, 1977
76. Nagao, S.; Suzuki, Y.; Watanabe, Y.; Nozawa, Y.
Activation by a calcium-binding protein of guanylate cyclase in *tetrahymena pyriformis*
Biochem. Biophys. Res. Commun. **90**: 261-268, 1979

77. Nishikawa, M.; Hidaka, H.
Role of Calmodulin in Platelet Aggregation. Structure-activity
relationship of Calmodulin-antagonists
J. Clin. Invest. **69**: 1348-1355, 1982
78. Norman, J.A.; Drummond, A.H.; Moser, P.
Inhibition of calcium-dependent regulator-stimulated phosphodiesterase
activity by neuroleptic drugs is unrelated to their clinical efficacy
Mol. Pharmacol. **16**: 1089-1094, 1979
79. O'Brien, J.R.
Effects of adenosine diphosphate and adrenaline on mean platelet shape
Nature **207**: 306-307, 1965
80. Payne, M.E.; Soderling, T.R.
Calmodulin-dependent glycogen synthase kinase
J. Biol. Chem. **255**: 8054-8056, 1980
81. Perrot, B.; Chap, H.J.; Douste-Blazy, L.
Asymmetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane
of human platelets
Biochim. Biophys. Acta **556**: 434-446, 1979
82. Rasmussen, H.
Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate
Science **170**: 404-412, 1970
83. Rittenhouse-Simmons, S.; Russel, F.A.; Deykin, D.
Mobilization of arachidonic acid in human platelets: Kinetics and
Ca²⁺-dependency
Biochim. Biophys. Acta **488**: 370-380, 1977
84. Rittenhouse-Simmons, S.; Russel, F.A.; Deykin, D.
Production of diglyceride from phosphatidylinositol in activated
platelets
J. Clin. Invest. **63**: 580-587, 1979
85. Rodbell, M.
The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in
membrane transduction
Nature **284**: 17-22, 1980

86. Roth, G.J.; Siok, C.J.
Acetylation of the NH₂-terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin
J. Biol. Chem. **253**: 3782-3784, 1978
87. Russel, F.A.; Deykin, D.
The effect of thrombin on the uptake and transformation of arachidonic acid by human platelets
Am. J. Hematol. **1**: 59-70, 1979
88. Salzman, E.W.; Rubino, E.B.; Sims, R.V.
Cyclic 3':5'-adenosine monophosphate in human blood platelets.
3. The role of cyclic AMP in platelet aggregation
Ser. Haematol. **3**: 100-113, 1970
89. Sanchez-Delgado, E.; Metz, G.
Histamine release: effects of cloxacepride, a calmodulin antagonist, on mast cells
Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **322**: Suppl. R 115, 1983
90. Sarkadi, B.; Enyedi, A.; Gardos, G.
Molecular properties of the red cell calcium pump. 1. Effects of calmodulin, proteolytic digestion and drugs on the kinetics of active calcium uptake in inside-out red cell membrane vesicles
Cell Calcium **1**: 287-297, 1980
91. Scharff, O.
Calmodulin - and its role in cellular activation
Review. Cell Calcium **2**: 1-27, 1981
92. Schmidt, R.F.
Erregungsübertragung von Zelle zu Zelle. In:
Schmidt, R.F. und Thews, G.
Physiologie des Menschen, 19. Auflage, Seite 33-54
Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1977
93. Scordilis, S.P.; Adelstein, R.S.
Myoblast myosin phosphorylation is a prerequisite for actin-activation
Nature **268**: 558-560, 1977

94. Smith, J.B.; Ogletree, M.L.; Lefer, K.M.; Nicolaou, K.C.
Antibodies which antagonise the effects of prostacyclin
Nature **274**: 64-65, 1978
95. Smoake, J.A.; Song, S.Y.; Cheung, W.Y.
Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Distribution and
developmental changes of enzyme and its protein activation in
mammalian tissue and cells
Biochim. Biophys. Acta. **341**: 402-411, 1974
96. Sobieszek, A.
Ca-linked phosphorylation of a light chain of vertebrate smooth-muscle
myosin
Eur. J. Biochem. **73**: 477-483, 1977
97. Sobue, K.; Ichida, S.; Yoshida, H.; Yamazaki, R.; Kakiuchi, S.
Occurance of a Ca^{2+} -and modulator protein - activable ATPase in
the synaptic plasma membranes of brain
FEBS Lett. **99**: 199-202, 1979
98. Srivastava, A.K.; Waisman, D.M.; Brostrom, C.O.; Soderling, T.R.
Stimulation of glycogen synthase phosphorylation by calcium-dependent
regulator protein
J. Biol. Chem. **254**: 583-586, 1979
99. Steer, M.L.; MacIntyre, D.E.; Levine, L.; Salzman, E.W.
Is prostacyclin a physiologically important circulating anti-platelet agent?
Nature **283**: 194-195, 1980
100. Talvenheimo, J.; Nelson, P.; Rudnick, G.
Mechanism of imipramine inhibition of platelet 5-Hydroxytryptamine
transport
J. Biol. Chem. **254**: 4631-4635, 1979
101. Tanaka, T.; Hidaka, H.
Hydrophobic regions function in calmodulin-enzyme(s) interaction
J. Biol. Chem. **255**: 11078-11080, 1980

102. Tco, T.S.; Wang, J.H.
Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca^{2+} -binding protein
J. Biol. Chem. **248**: 5950-5955, 1973

103. Van Belle, H.
The effect of drugs on Calmodulin and its interaction with phosphodiesterase
Adv. Cyclic Nucleotide Res. **17**: 557-567, 1984

104. Vargaftig, B.B.; Chignard, M.; Benveniste, J.
Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation
Biochemical Pharmacology **30**: 263-271, 1981

105. Wang, J.H.; Sharma, R.K.; Huang, C.Y.; Chau, V.; Chock, P.B.
The mechanism of cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin
N.Y. Acad. Sci. **356**: 190-204, 1980

106. Watterson, D.M.; Sharief, F.; Vanaman, T.C.
The complete amino acid sequence of the Ca^{2+} -dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain
J. Biol. Chem. **255**: 962-975, 1980

107. Weiss, B.; Fertel, R.; Figlin, R.; Uzunov, P.
Selective alteration of the activity of the multiple forms of adenosine 3', 5' monophosphate phosphodiesterase of rat cerebrum
Mol. Pharmacol. **10**: 615-625, 1974

108. Weiss, H.J.; Hoyer, L.W.; Rickles, F.R.; Varma, A.; Rogers, J.
Quantitative assay of a plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content
J. Clin. Invest. **52**: 2708-2716, 1973

109. Weiss, B.; Prozialeck, W.; Cimino, M.; Sellinger-Barnette, M.; Wallace, T.L.
Pharmacological regulation of calmodulin
Ann. N.Y. Acad. Sci. **356**: 319-345, 1980

110. Wells, J.N.; Hardman, J.G.
Cyclic nucleotide phosphodiesterases
Adv. Cyclic Nucl. Res. **8**: 119-143, 1977
111. White 11, G.C.; Levine, S.; Steiner, A.
Platelet calcium-dependent proteins: Identification and localization
of the calcium-dependent regulator, calmodulin, in platelets
Am. J. Hematol. **10**: 359-367, 1981
112. White, G.C.; Raynor, S.T.
The effects of trifluoperazine, an inhibitor of calmodulin, on
platelet function
Thrombos. Res. **18**: 279-284, 1980
113. White, G.J.
Platelet morphology and function. In:
Williams, W.J., ed.
Hematology, p. 1159
New York: McGraw Hill, 1977
114. Wielosz, M.; Salmons, M.; Gaetano, G.; Garattini, S.
Uptake of ¹⁴C-5-Hydroxytryptamine by human and rat platelets and
its pharmacological inhibition
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **784**: 59-65, 1976
115. Witte, L.D.; Kaplan, K.I.; Nossee, H.L.; Lages, B.A.; Weiss, H.J.;
Goodman, D.S.
Studies of the release from human platelets of the growth factor for
cultured human arterial smooth muscle cells
Circ. Res. **42**: 402-409, 1978
116. Wong, P.Y.-K.; Cheung, W.Y.
Calmodulin stimulated human platelet phospholipase A₂
Biochem. Biophys. Res. Commun. **90**: 473-480, 1979
117. Wong, P.Y.-K.; Lee, W.H.; Chao, P.H.-W.; Cheung, W.Y.
The role of calmodulin in prostaglandin metabolism. Calmodulin and
cell function
Ann. N.Y. Acad. Sci. **356**: 179-189, 1980

118. Yagi, K.; Yazawa, M.; Kakiuchi, S.; Oshima, M.; Uenishi, K.
Identification of an activator protein for myosin light chain kinase
as the Ca^{2+} -dependent modulator protein
J. Biol. Chem. **253**: 1338-1340, 1978
119. Yamauchi, T.; Fujisawa, H.
Activation of tryptophan 5-monooxygenase by calcium-dependent
regulator protein
Biochem. Biophys. Res. Commun. **90**: 28-35, 1979
120. Yamauchi, T.; Fujisawa, H.
Involvement of calmodulin in the Ca^{2+} -dependent activation of
rat brain tyrosine-3-monooxygenase
Biochem. Int. **1**: 98-104, 1980

Für die Überlassung des Themas, sowie für seine wissenschaftliche Anleitung danke ich Herrn Dr. K. Gietzen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Professor Dr. A. Schmid für seine freundliche Bereitschaft die Arbeit der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität vorzustellen.

LEBENS LAUF

Geburtstag: 09.06.1954

Geburtsort: Geislingen/Eybach

Eltern: Anne Heller, geb. Clement
Hans Heller, Metzgermeister

Familienstand: ledig

Schul Ausbildung: 1961 - 1965 Volksschule Eybach
1965 - 1974 Gymnasium Geislingen

Wehrdienst: 1974 - 1976 SAZ 2, Abgang als Leutnant
der Reserve

Berufsausbildung: 1976 - 1977 Auszubildender im Fleischerhandwerk,
1977 Gesellenprüfung

Studium: ab Wintersemester 1978 Studium der Tiermedizin
an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Staatsexamen: 1983 in München

Approbation: 1983

